Guide technique pour l'etude du suivi des effets sur l'environnement : pates et papiers [chap. 11]

[Titre fourni par le catalogueur]

Table des matières

11. Méthodes alternatives de suivi 11-1

11.1 Utilisation des mésocosmes comme méthode de suivi de rechange 11-1
11.1.1 Aménagement de cours d'eau artificiels 11-1
11.1.2 Applicabilité dans le cadre des programmes d'ESEE 11-6
11.1.2.1 ESEE des usines de pâtes et papiers 11-6
11.1.2.2 ESEE des mines de métaux 11-7
11.1.2.2.1 Suivi initial et périodique 11-7
11.1.2.2.2 Suivi ciblé 11-7
11.1.2.2.3 Étude de suivi sur la recherche des causes 11-7
11.1.3 Technologie des mésocosmes 11-8
11.1.3.1 Pertinence de la conception des mésocosmes 11-8
11.1.4 Description et fonctionnement général d'un large système de mésocosmes mobile 11-8
11.1.5 Facteurs à considérer pour le choix du site 11-15
11.1.6 Plans d'études de suivi biologique 11-16
11.1.6.1 Vue d'ensemble 11-16
11.1.7 Traitements à l'étude 11-17
11.1.8 Répétition 11-18
11.1.9 Tailles des l'échantillons et rôle de la taille de l'effet 11-19
11.1.9.1 Absence de données préalables (historiques) 11-19
11.1.9.2 Données préalables (historiques) disponibles 11-20
11.1.10 Étude de suivi des poissons – Évaluation des effets 11-21
11.1.10.1 Plan d'étude 11-21
11.1.10.1.1 Choix d'espèces 11-21
11.1.10.2 Mesures terminales biologiques 11-22
11.1.10.3 Période et durée de l'exposition aux effluents 11-23
11.1.10.4 Méthodologie relative au poisson 11-24
11.1.10.4.1 Installation générale 11-24
11.1.10.4.2 Entretien et surveillance 11-27
11.1.10.4.3 Échantillonnage et analyse des poissons 11-27
11.1.10.5 Évaluation et interprétation des données 11-28
11.1.10.5.1 Exigences générales 11-28
11.1.10.5.2 Analyse statistique des paramètres 11-28
11.1.10.5.3 Analyse de la variance à plusieurs niveaux 11-30
11.1.10.5.4 Analyse de covariance 11-31
11.1.10.6 AQ/CQ et analyse des données 11-31
11.1.11 Évaluation des effets sur la communauté d'invertébrés benthiques 11-32
11.1.11.1 Plan d'étude 11-32
11.1.11.1.1 Sélection de l'espèce 11-32
11.1.11.2 Mesures terminales 11-33
11.1.11.2.1 Mesures terminales biologiques 11-33
11.1.11.3 Période et durée de l'exposition aux effluents 11-34
11.1.11.4 Protocole relatif aux invertébrés benthiques 11-35
11.1.11.4.1 Installation générale 11-35
11.1.11.4.2 Entretien et surveillance 11-36
11.1.11.5 Échantillonnage et analyse des algues et des invertébrés benthiques 11-37
11.1.11.6 Évaluation et interprétation des données 11-38
11.1.12 Mesures d'appui 11-39
11.1.12.1 Mesures terminales liées à la chimie de l'eau 11-39
11.1.13 Mesures terminales d'exposition 11-40
11.1.14 Autres facteurs à considérer 11-41
11.1.15 Bibliographie 11-43

11.2 Utilisation de bivalves en cage comme méthode alternative de suivi 11-49
11.2.1 Introduction 11-49
11.2.2 Contexte 11-49
11.2.3 Approche 11-51
11.2.4 Choix de l'espèce 11-51
11.2.4.1 Taxons utilisés le plus fréquemment 11-52
11.2.4.2 Bivalves marins et estuariens 11-54
11.2.4.3 Bivalves dulcicoles 11-55
11.2.4.4 Sources 11-56
11.2.4.5 Taille et âge 11-57
11.2.4.6 Nombre d'organismes 11-57
11.2.4.7 Conditions de manipulation et de conservation 11-58
11.2.5 Plan d'étude 11-59
11.2.6 Plan d'échantillonnage 11-59
11.2.6.1 Choix des zones et des stations 11-60
11.2.7 Réplication 11-61
11.2.7.1 Nombre de stations 11-61
11.2.7.2 Réplication et pseudoréplication 11-62
11.2.7.3 Application de la réplication au plan d'étude 11-64
11.2.7.4 Moment et durée de l'étude 11-66
11.2.7.5 Facteurs confondants ou de modification et mesures supplémentaires 11-67
11.2.7.6 Configuration des cages 11-68
11.2.7.7 Systèmes d'ancrage 11-69
11.2.8 Variables à mesurer 11-70
11.2.8.1 Survie 11-74
11.2.8.2 Croissance 11-74
11.2.8.3 Condition 11-76
11.2.9 Méthodes à utiliser pour le début de l'essai, le déploiement et la récupération des cages et la fin de l'essai 11-77
11.2.9.1 Début de l'essai 11-77
11.2.9.2 Déploiement des cages 11-78
11.2.9.3 Récupération des cages et fin de l'essai 11-78
11.2.10 Analyses des données 11-79
11.2.11 Concentrations tissulaires 11-80
11.2.11.1 Dioxines et furannes 11-80
11.2.11.2 Autres produits chimiques 11-81
11.2.12 Rapports 11-81
11.2.13 Références 11-81

Liste des tableaux

Tableau 11-1: Résumé des applications en cours d'eau artificiels, ayant servi à l'évaluation des effets des effluents des usines de pâtes et papiers et des effluents miniers sur les écosystèmes aquatiques, pour le programme de suivi des effets sur l'environnement canadien..... 11-3
Tableau 11-2: Résumé des données recueillies dans le cadre des études en cours d'eau artificiels menées au Canada, durant la dernière décennie (d'après Dubé *et al.* , 2001a)..... 11-5
Tableau 11-3: Effets sur le poisson - Paramètres biologiques recommandés pour déterminer les effets (un effet étant ici défini comme une différence statistiquement significative entre les bassins d'exposition et les bassins de référence)..... 11-29
Tableau 11-4: Paramètres biologiques à utiliser pour les analyses complémentaires. Ces analyses sont menées à des fins d'information et l'effet n'est pas nécessairement déterminé en fonction des différences statistiquement significatives entre les bassins d'exposition et de référence..... 11-29
Tableau 11-5: Tableau de l'analyse de la variance à plusieurs niveaux, avec deux traitements, quatre bassins répétés par traitement et *n* échantillons individuels ou composites dans chaque bassin répété..... 11-31
Tableau 11-6: Tableau de l'analyse de la variance selon un protocole par mesures répétées (MR) avec deux traitements, quatre bassins répétés par traitement et *t* temps de mesure..... 11-39
Tableau 11-7: Critères d'évaluation des solutions de rechange proposées pour le programme d'ESEE (d'après Dubé *et al.*, 2001a)..... 11-41
Tableau 11-8: Taxons suggérés pour les études de bivalves en cage menées dans le cadre des ESEE..... 11-53
Tableau 11-9: Exemple de fiche de terrain pour l'enregistrement des données brutes sur la survie et la croissance..... 11-72
Tableau 11-10: Mesures de la croissance..... 11-74
Tableau 11-11: Résumé des procédures statistiques permettant l'analyse des paramètres dans les études de bivalves en cage..... 11-79

Liste des figures

Figure 11-1: Photo du système de mésocosmes sur remorque utilisé pour l'ESEE 11-10
Figure 11-2 : Représentation schématique (non à l'échelle) du système de mésocosmes sur remorque (d'après Dubé, 2000) 11-11
Figure 11-3 A) Mésocosme 11-13
Figure 11-4: Pale de ventilateur servant à maintenir la vitesse du courant 11-14
Figure 11-5 Scénarios de répartition des poissons où A) les adultes et les juvéniles sont placés dans le même bassin et B) les adultes et les juvéniles sont placés dans des bassins distincts. En situation réelle, la répartition des bassins entre les divers traitements se fait de façon aléatoire 11-26
Figure 11-6: Exemple de système d'ancrage pour les bivalves 11-71

104-02389/

11. Méthodes alternatives de suivi

Dans certains sites d'industrie de pâtes et papiers, il peut arriver qu'on ne puisse procéder aux études de suivi requises sur les poissons et les communautés d'invertébrés benthiques. Et bien que les raisons de cette impossibilité varient en fonction de chaque site, les plus fréquentes sont la présence de conditions dangereuses (p. ex., vitesse élevée du courant) ou de facteurs confondants– par exemple le rejet d'autres effluents dans la zone d'exposition – qui font qu'il est difficile, voire impossible, d'attribuer un effet précis à l'effluent à l'étude.

Lorsque la fabrique ne peut concevoir une étude sur les poissons ou les communautés d'invertébrés benthiques en tenant compte des facteurs confondants présents dans le milieu, elle doit en fournir les raisons scientifiques et proposer d'autres méthodes de suivi qui soient rentables, techniquement réalisables et conformes au plan de l'étude.
Le présent chapitre traite d'un certain nombre de méthodes alternatives de suivi recommandées. D'autres méthodes scientifiquement défendables peuvent aussi être choisies, à la condition qu'elles produisent des résultats qui permettent de déterminer si l'effluent a une incidence sur les populations de poissons (croissance, reproduction, état et survie), les tissus des poissons (taux de dioxines et furannes) ou la communauté d'invertébrés benthiques (densité des invertébrés benthiques, richesse des taxons, indice de diversité de Simpson et indice Bray-Curtis). Les études en mésocosmes, les bivalves en cage et les essais de toxicité sublétale élargis sont les méthodes de remplacement recommandées pour le suivi du poisson. Dans le cas des invertébrés benthiques, l'étude en mésocosmes est la méthode recommandée.

11.1 Utilisation des mésocosmes comme méthode de suivi de rechange

11.1.1 Aménagement de cours d'eau artificiels

Le Programme d'étude de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) a été introduit dans le but de faciliter l'évaluation de la pertinence du *Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers* et du *Règlement sur les effluents des mines de métaux*, établis sous le régime de la *Loi sur les pêches* du gouvernement fédéral. Ce programme vise à assurer un suivi des effets, qui soit uniforme à l'échelle nationale tout en tenant compte des facteurs spécifiques du site. Les exigences du programme et les orientations en matière de suivi sont définies dans Environnement Canada (1992, 1995a, 1995b, 1997, 1998, 2001). Le suivi des poissons et des invertébrés benthiques, de même que l'analyse des paramètres environnementaux connexes (p. ex., chimie des effluents et de l'eau, essais de toxicité sublétale et chimie des sédiments), dans les zones de référence et les zones d'exposition, sont les principales composantes des programmes d'ESEE visant à évaluer les effets d'un effluent. *Cette évaluation se fait habituellement par des études sur le terrain, car ce type d'études est celui qui convient le mieux, sur le plan environnemental, à l'évaluation des effets.* Cependant, il peut arriver que les études sur le terrain ne puissent fournir l'information voulue, par exemple s'il existe des facteurs confondants

dans le milieu récepteur ou que les conditions rendent l'échantillonnage dangereux. S'il est impossible de procéder aux études sur le terrain normalisées, prévues dans le programme d'ESEE, d'autres méthodes scientifiquement défendables, rentables et techniquement réalisables peuvent être envisagées.

L'étude en cours d'eau artificiels, ou mésocosmes, est une de ces méthodes alternatives scientifiquement « défendables » qui est recommandée (voir la section 11.2 pour plus d'informations sur l'utilisation des bivalves en cage). Cette recommandation s'appuie sur des années de recherche et développement qui ont démontré que les systèmes de mésocosmes peuvent produire des données sur les effets des effluents, qui soient de bonne qualité et qui répondent au cadre réglementaire (Culp et Cash, 1995; Culp et Podemski, 1996; Culp *et al.*, 1996; Culp et Lowell, 1998; Culp *et al.*, 2000a; 2000b; Dubé et MacLatchy, 2000; Lowell *et al.*, 2000; Culp *et al.*, 2001; Dubé *et al.*, 2001a; 2001b). Depuis 1991, l'Institut national de recherche sur les eaux (INRE) d'Environnement Canada poursuit la mise au point de systèmes de cours d'eau artificiels utilisés sur place pour évaluer les effets d'effluents de sources ponctuelles sur les écosystèmes aquatiques. Au Canada, de telles études en cours d'eau artificiels ont été menées 14 fois entre 1993 et 2000 en vertu du programme d' ESEE (tableau 1) (Dubé *et al.*, 2001a). Le tableau 2 résume les données recueillies dans le cadre de ces études, notamment quant à l'éventail des milieux récepteurs étudiés, aux types d'effluents, aux paramètres spécifiques mesurés en regard des différents niveaux d'organisation biologique et aux hypothèses vérifiées.

Un large cours d'eau artificiel a notamment été utilisé pour l'Étude des bassins des rivières du Nord (1991-1996), dans le cadre d'un programme d'évaluation environnementale intégré visant à déterminer les effets des éléments nutritifs et des contaminants contenus dans les effluents des usines de pâtes sur les communautés benthiques de la rivière Athabasca (Alberta) (Culp et Podemski, 1996; Culp *et al.* 1996; Podemski et Culp, 1996; Culp *et al.*, 2001). Des études similaires ont été réalisées en Colombie-Britannique, de 1991 à 1998, dans la rivière Thompson et le fleuve Fraser en vertu du Plan d'action du Fraser. Dans ce dernier cas, l'utilisation de cours d'eau artificiels avait pour but de préciser les effets des effluents d'usines de pâtes sur le benthos de différentes rivières (Culp et Cash, 1995; Lowell *et al.* 1995; Culp *et al.* 1996; Dubé et Culp, 1996; Lowell *et al.*, 1996; Culp *et al.*, 2000a; Lowell *et al.*, 2000). Des cours d'eau artificiels ont aussi été utilisés lors de trois études pilotes menées à la fin des années 90, pour évaluer les effets des effluents d'usines de pâtes sur des poissons de petite taille dans le cadre du programme d'étude de suivi des effets (ESEE) en milieux estuariens (rivière Saint-Jean, N.-B.) (Dubé 2000b; Dubé et *al.*,2001a).

Tableau 11-1: Résumé des applications en cours d'eau artificiels, ayant servi à l'évaluation des effets des effluents des usines de pâtes et papiers et des effluents miniers sur les écosystèmes aquatiques, pour le programme de suivi des effets sur l'environnement canadien

Année	Programme[1]	Objectif de la recherche	Lieu	Système de cours d'eau artificiel	Références
1993-1994	EBRN	Déterminer les effets des éléments nutritifs et des contaminants contenus dans les EUP[2] sur les algues périphytiques et les communautés d'invertébrés benthiques.	Rivière Athabasca, Hinton (AB)	Modèle I : Large mésocosme fixe	Podemski (1999) Culp et Podemski (1996) Podemski et Culp (1996) Culp *et al.* (1996) Culp *et al.* (2001)
1993-1994	PAF	Évaluer les effets des EUP de plus en plus concentrés (0,25 % -10 %) sur le périphyton et les chironomes (Diptère *Orthocladiinae*).	Rivière Thompson, Kamloops (CB)	Petit microcosme	Dubé (1995) Dubé et Culp (1996) Dubé *et al.* (1997) Lowell *et al.* (2000)
1993	PAF	Déterminer les effets liés à la teneur en éléments nutritifs des EUP sur l'éphéméroptère (Ephéméroptère *Baetis tricaudatus).*	Rivière Thompson, Kamloops (CB)	Petit microcosme	Lowell *et al.* (1995) Lowell *et al.* (1996) Culp *et al.* (1996) Lowell *et al.* (2000)
1994	PAF	Déterminer les effets des EUP (1 % et 3 %) sur le périphyton et les communautés d'invertébrés benthiques.	Fleuve Fraser, Prince George (CB)	Modèle II : Large mésocosme mobile	Culp et Cash (1995) Culp *et al.* (1996) Culp *et al.* (2000)
1997	ESEE - pâtes et papiers	Évaluer les effets des EUP (3 %) sur un poisson de petite taille (*Fundulus heteroclitus*) en milieu marin.	Port de Saint John, Saint John (NB)	Modèle II : Large mésocosme mobile	Dubé et al. (2001)
1997-1998	ESEE - pâtes et papiers	Déterminer les effets de l'EUP terminal, des différents flux de déchets en usine et d'une modification des procédés sur un poisson de petite taille (*Fundulus heteroclitus*) en milieu estuarien.	Rivière Saint-Jean, Saint John (NB)	Modèle II : Large mésocosme mobile	Dubé (2000) Dubé et MacLatchy (2000a) Dubé *et al.* (2001)
1999	IRST	Déterminer les effets des EUP soumis à des traitements primaire et secondaire sur un poisson de petite taille (*Fundulus heteroclitus*) en milieu estuarien.	Rivière Miramichi, Miramichi (NB)	Modèle III : Large mésocosme mobile	Dubé *et al.* (2001)
1999-	IRST	Déterminer les effets cumulatifs des EUP et	Rivière Saint-	Microcosme modulaire	Culp, Dubé, Cash,

2000		des égouts municipaux sur les communautés d'algues et d'invertébrés benthiques.	Jean, Edmundston (NB)	moyen	MacLatchy, Glozier (inédit)
2000	IRST	Déterminer les effets des EMM[3] sur les saumons atlantiques juvéniles (*Salmo salar*).	Rivière Little, Mines Brunswick, Miramichi (NB)	Modèle III : Large mésocosme mobile	Culp, Dubé, Cash, MacLatchy, Glozier (inédit)
2000	IRST	Déterminer les effets des EMM sur les algues et les communautés d'invertébrés benthiques.	Rivière Little, Mines Brunswick, Miramichi (NB)	Microcosme modulaire moyen	Culp, Dubé, Cash, MacLatchy, Glozier. (inédit)
2000	IRST	Déterminer les effets des EMM sur un réseau trophique incluant des algues, des invertébrés benthiques et le chabot visqueux (*Cottus cognatus).*	Rivière Little, Mines Brunswick, Miramichi (NB)	Microcosme modulaire moyen	Culp, Dubé, Cash, MacLatchy, Glozier (inédit)

[1]EBRN : Étude des bassins des rivières du Nord; PAF : Plan d'action du Fraser; ESEE : Programme national d'étude de suivi des effets sur l'environnement des usines de pâtes et papiers (EC, 1992); IRST : Initiative de recherche sur les substances toxiques. [2] EUP : Effluent des usines de pâtes. [3] EMM : Effluent des mines de métaux.

Tableau 11-2: Résumé des données recueillies dans le cadre des études en cours d'eau artificiels menées au Canada, durant la dernière décennie (d'après Dubé *et al.* , 2001a)

Milieu récepteur	Types d'effluent[1]	Paramètres de mesure					Hypothèses vérifiées
		Producteurs primaires	Décomposeurs	Invertébrés benthiques	Métabolisme	Poisson	
• Eau douce • Estuaire • Marin	EUP • UPKB • UPTM • Bisulfite EMM	• Biomasse • Composition de la communauté • Espèce indicatrice • Contaminants tissulaires	• Taux de décomposition • Composition des espèces fongiques • Taux de sporulation des champignons	• Abondance et biomasse • Composition de la communauté • Taux d'émergence • Richesse, diversité, mesures de rapport • Indicateurs du développement (ébauche alaire)	• Production primaire brute et nette • Respiration microbienne • Étude des isotopes de l'oxygène	• Croissance • Mortalité • État • Taille du foie • Taille des gonades • Hormones de reproduction • Métaux dans les tissus • Induction OFM[2] • Contaminants dans la bile • « Réactions de stress » (glycogène musculaire)	• Effets des effluents • Cause des effets (flux de déchets produits par l'usine, éléments nutritifs ou contaminants) • Modification des procédés • Effets cumulatifs

[1] EUP = Effluent des usines de pâtes; UPKB = usine de pâte kraft blanchie; UPTM = usine de pâte thermomécanique; EMM = Effluent des mines de métaux [2] OFM = induction de l'oxygénase à fonction mixte.

La plus récente phase des travaux sur le développement de cours d'eau artificiels a débuté en 1999, en vertu de l'Initiative de recherche sur les substances toxiques (Culp, Cash, Dubé, Glozier, MacLatchy, inédit). Des cours d'eau artificiels ont été mis au point pour évaluer les effets d'effluents d'usines de pâtes et d'effluents miniers sur le benthos, le poisson et les réseaux trophiques aquatiques de rivières (c.-à-d. applications multitrophiques autoentretenues, y compris les algues, le benthos et le poison (Dubé *et al.*, 2001a)).

Le présent document vise à définir des critères devant guider la conception et la mise en oeuvre des études en mésocosmes proposées comme méthodes alternatives au programme d'ESEE pour évaluer les effets des EUP et des effluents des mines de métaux (EMM) sur les invertébrés benthiques et le poisson. Il vise également à préciser les normes recommandées pour assurer une démarche scientifique rigoureuse et ainsi satisfaire aux exigences du programme d'ESEE. À noter que ce document sera mis à jour régulièrement, à mesure que de nouvelles données et de nouvelles recherches seront disponibles. Afin de vous assurer que les plus récentes mises à jour sont incluses dans le document, consultez notre site Web, à l'adresse www.ec.gc.ca/eem, ou contactez le Bureau national de l'ESEE d'Environnement Canada (téléphone : (819) 997-1535; télécopieur : (819) 953-0461; courriel : eem-esee@ec.gc.ca).

11.1.2 Applicabilité dans le cadre des programmes d'ESEE

Il convient d'insister sur le fait que, même si le système de mésocosmes figure parmi les méthodes alternatives recommandées, il ne doit être utilisé que s'il est impossible de procéder aux études sur le terrain. L'utilisation de cours d'eau artificiels peut notamment être indiquée lorsque des facteurs confondants compliquent l'étude du milieu récepteur ou que les conditions rendent l'échantillonnage dangereux. Dans le premier cas, il peut s'agir de variables confusionnelles présentes dans le milieu récepteur, par exemple si le milieu comporte des zones où des effets historiques ont été observés, s'il n'existe aucune zone de référence adéquate pour servir de base de comparaison, s'il y a rejet d'autres effluents dans ce milieu ou s'il est impossible de tenir compte, dans le plan d'étude sur le terrain, des changements dans les habitats visés. L'utilisation de mésocosmes comporte à la fois des avantages et des inconvénients qu'il importe d'évaluer en regard des avantages et des inconvénients des autres méthodes alternatives, avant d'arrêter son choix sur une méthode précise. Les méthodes alternatives recommandées pour le poisson sont les études en mésocosmes, l'utilisation de bivalves en cage et les essais de toxicité sublétale élargis. Dans le cas des communautés d'invertébrés benthiques, l'étude en mésocosmes est la méthode alternative recommandée.

11.1.2.1 ESEE des usines de pâtes et papiers

En vertu du *Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers* actuel, l'utilisation d'une méthode de rechange – lorsqu'il est impossible de procéder aux études sur le terrain prévues dans les arbres de décision des études sur le poisson et les invertébrés benthiques – n'est *obligatoire* que lorsque cette méthode est incluse dans la réglementation (Environnement Canada, 1998). Environnement Canada est toutefois à revoir le *Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers* et le *Règlement sur les effluents de la fabrique de pâtes et papiers de Port Alberni* établis sous le régime de la *Loi sur les pêches*. Les modifications proposées visent entre autres à recommander l'utilisation de méthodes alternatives de suivi pour évaluer les effets sur le

poisson et les invertébrés benthiques, y compris l'utilisation de mésocosmes. Il est en outre proposé que ces modifications réglementaires entrent en vigueur à l'issue du cycle 3 (soit le 1er avril 2004).

Même si les exigences actuelles du programme d'ESEE continuent de s'appliquer tant que le processus d'amendement réglementaire ne sera pas complété (fin du cycle 3), les usines incapables de réaliser les études sur le terrain durant le cycle 3 peuvent proposer des méthodes alternatives (p. ex., mésocosmes, bivalves en cage) à leur agent d'autorisation. De fait, les mésocosmes ont été approuvés comme alternative dans certaines usines durant le cycle 2 et leur utilisation a été proposée dans d'autres usines pour le cycle 3. Des méthodes alternatives peuvent donc être utilisées durant le cycle 3 si elles sont approuvées par l'agent d'autorisation, même si les modifications au *Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers*, visant à *exiger* l'utilisation de ces méthodes, ne sont pas encore en vigueur (début du cycle 4).

11.1.2.2 ESEE des mines de métaux

11.1.2.2.1 Suivi initial et périodique

Les mésocosmes peuvent servir à évaluer les effets des EMMsur les invertébrés benthiques et le poisson, lorsqu'il est impossible de procéder aux études traditionnelles sur le terrain prévues dans le programme d'ESEE (Environnement Canada, 2001). Lorsque des effets sont observés, il est essentiel que ces effets soient confirmés lors d'une phase de suivi subséquente (Suivi périodique - confirmation). La mine peut également procéder à un suivi ciblé ou à la recherche des causes, à tout moment durant le programme lorsqu'un effet est observé. Si aucun effet n'est décelé durant la phase de suivi, cette absence d'effets doit elle aussi être confirmée durant une phase subséquente (suivi périodique - surveillance). Par ailleurs, il est essentiel que le plan d'étude de la ou des phases subséquentes détermine si le système de mésocosmes préalablement utilisé a optimisé le potentiel de détection des effets. À cette fin, divers facteurs doivent être évalués, notamment la pertinence de l'espèce choisie, la période de l'étude, la taille de l'échantillon, la puissance des analyses et le niveau d'exposition à l'effluent durant les études en mésocosmes.

11.1.2.2.2 Suivi ciblé

Une fois que des effets ont été documentés et confirmés par des études sur le terrain ou des études en mésocosmes, il faut en préciser l'ampleur et l'étendue géographique (suivi ciblé). Ceci peut se faire à l'aide d'un système de mésocosmes, en mesurant les réactions du biote à une série de dilutions réalistes sur le plan environnemental, en évaluant les effets de l'effluent sur des biotes sensibles ou écologiquement appropriés, ou encore en évaluant les effets de l'effluent sur des habitats écologiquement appropriés. Un des objectifs des phases subséquentes pourrait être de déterminer si un effet similaire se manifeste chez d'autres espèces (c.-à-d. évaluer l'ampleur de l'effet). Enfin, les études en mésocosmes offrent une certaine souplesse qui permet, s'il y a lieu, de procéder en même temps au suivi initial ou périodique et au suivi ciblé (Dubé *et al.*, 2001a).

11.1.2.2.3 Étude de suivi sur la recherche des causes

Lorsqu'on a déterminé l'ampleur et l'étendue géographique des effets sur le poisson, mais que les études préalables n'ont pu en préciser la cause, on procède à une étude de suivi sur la recherche des causes. On peut là aussi utiliser les mésocosmes pour étudier les mécanismes causals associés à l'effet observé. Ainsi, Lowell *et al.* (1995), Culp *et al.* (1996), Dubé et Culp (1996) et Culp *et al.* (2001) montrent comment un protocole d'étude basé sur la relation dose-effet peut établir une distinction entre les effets dus aux nutriments et ceux causés par les contaminants contenus dans les EUP sur les réseaux trophiques benthiques. D'autres études, réalisées par Dubé (2000), Dubé et MacLatchy (2000, 2001) et Dubé *et al.* (2001b), montrent l'application de cours d'eau artificiels pour isoler et déterminer la contribution de différents cycles de procédés sur la qualité de l'effluent final et ses effets sur le poisson.

11.1.3 Technologie des mésocosmes

11.1.3.1 Pertinence de la conception des mésocosmes

Afin de maintenir la qualité des données et d'assurer l'application uniforme de la technologie des mésocosmes aux fins du programme d'ESEE, il faut revoir la conception physique du système utilisé et le plan d'étude, y compris les modes opératoires normalisés. Le présent guide définit les exigences en matière de licences et propose des conseils relatifs à la conception physique du système et au plan d'étude pour l'utilisation du large système de mésocosmes mobile créé par l'INRE.

Les travaux sur ce large système de mésocosmes se poursuivent. On travaille également à la mise au point d'un système modulaire plus petit, pour les programmes d'ESEE. Les versions modifiées du présent guide feront mention des améliorations qui seront apportées, ainsi que des possibilités de licences qui s'offriront, à mesure que les technologies seront mises au point.

11.1.4 Description et fonctionnement général d'un large système de mésocosmes mobile

Le système de mésocosmes recommandé ici a été conçu par l'INRE et il a été utilisé pour évaluer les effets des EUP et des EMM sur les réseaux trophiques benthiques (invertébrés benthiques et algues) (Culp et Podemski, 1996; Culp *et al.*, 1996, Culp *et al.*, 2000a; Culp *et al.*, 2001; Dubé *et al.*, 2001a) et sur un poisson de petite taille (Dubé, 2000; Dubé et MacLatchy, 2000; Dubé *et al.*, 2001a; 2001b). Le système consiste en 16 bassins circulaires d'une superficie de 0,9 m^2, disposés par paires sur des tables d'une hauteur de 74 cm (figures 1 et 2). L'eau puisée d'une zone de référence est pompée dans un réservoir de tête de polyéthylène d'une capacité de 378 L, placé sur une plate-forme de 1,2 m de hauteur, et elle s'écoule dans les bassins par gravité, à travers un réseau de canalisations. On peut aussi utiliser une pompe d'admission – par exemple une pompe terrestre (p. ex., pompe d'irrigation ou pompe de piscine vendue dans le commerce) ou une pompe submersible (Hydro-MaticJ modèle n° SPD50-H de 0,5 HP), selon le volume à pomper, la distance de pompage et la hauteur d'élévation requise. L'eau de référence peut également être puisée de la prise d'eau de l'usine. Des robinets-vannes servent à régler et à étalonner le débit d'eau dans chaque bassin. Le débit de l'eau dans chaque bassin est de 2 L/min; le débit total doit donc être de 32 L/min pour alimenter les 16 bassins (figure 3a). L'eau dans chaque bassin est

maintenue à une hauteur de 26,9 ± 0,1 cm ($\bar{x}$ ± 1 E.-T.) au moyen d'un tuyau de trop-plein qui rejette toutes les eaux usées dans la rivière (figure 3b). Ce tuyau est muni d'une grille pour éviter la perte de poissons et limiter l'émigration des insectes des bassins (figure 3c). Chaque bassin contient 227 L d'eau; le temps de séjour de l'eau est donc d'environ deux heures. En augmentant à quatre heures le temps de séjour de l'eau dans les bassins, on réduit au minimum le volume d'effluents et d'eau de référence requis pour l'étude. Les résultats d'études antérieures indiquent toutefois que le temps de séjour optimal est de deux heures. Cependant, la détermination finale du temps de séjour, dans un système donné, dépend de la taille du bassin utilisé et des besoins des espèces à l'étude, relativement au taux d'oxygène et à la température. Si les études en mésocosmes sont réalisées à la fin de l'automne, le réservoir de tête et les conduites d'alimentation en eau peuvent être enveloppés de ruban chauffant et isolés, afin que le système puisse être utilisé même si la température descend sous le point de congélation (-5 °C). En été, une toile de protection peut être utilisée pour réduire le chauffage solaire.

Figure 11-1: Photo du système de mésocosmes sur remorque utilisé pour l'ESEE

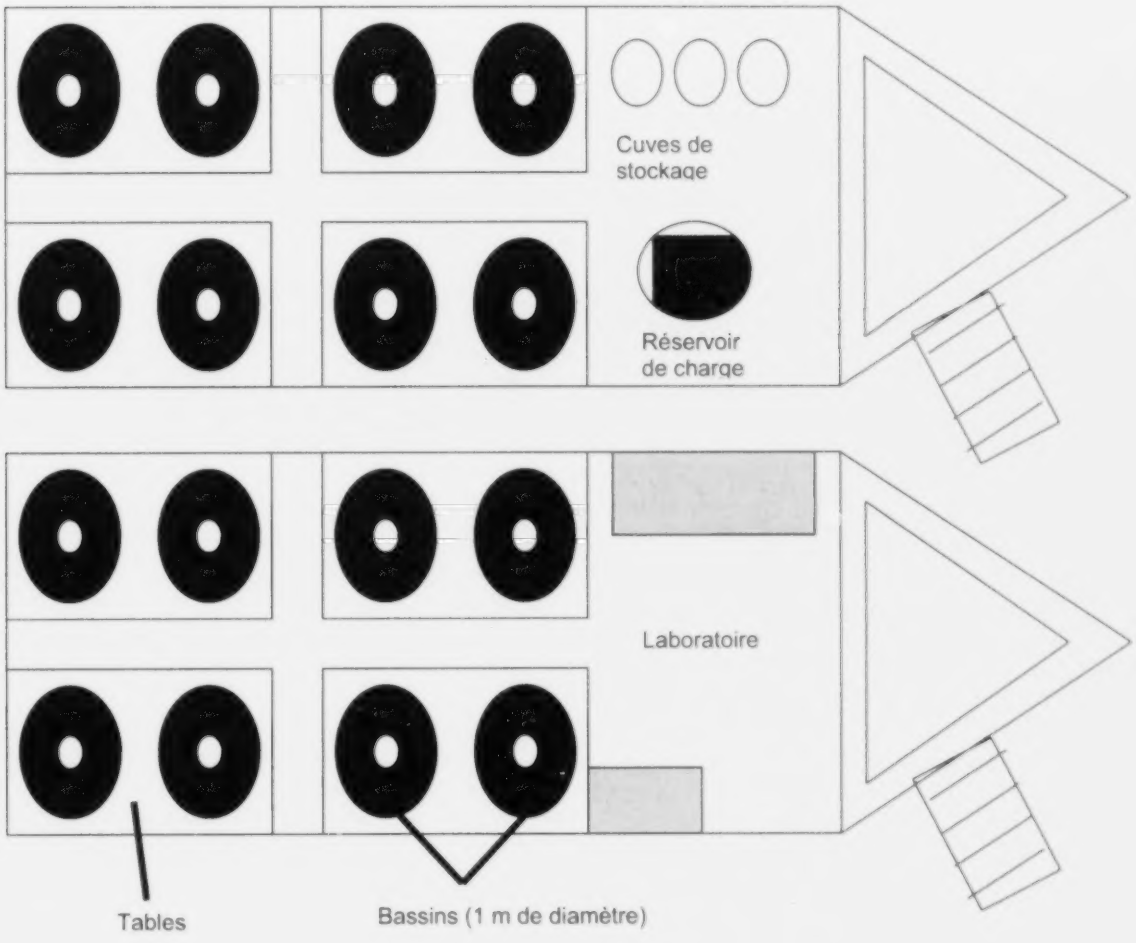
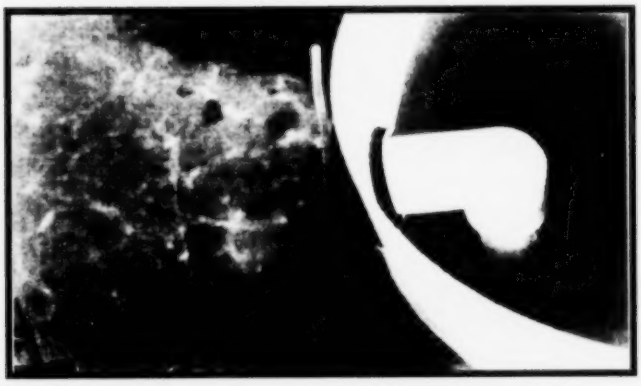


Figure 11-2 : Représentation schématique (non à l'échelle) du système de mésocosmes sur remorque (d'après Dubé, 2000)

Les bassins qui forment le grand système de mésocosmes consistent en des cuves de fibre de verre et de polyester de 107 cm de diamètre (figure 1). Les bassins sont fabriqués en coupant des sections de 38 cm de longueur d'un tuyau de 107 cm et en y collant une feuille plate de fibre de verre à une extrémité. Une section de tuyau de 25 cm de diamètre, dont la partie inférieure a été découpée, est ensuite placée au centre du tuyau plus large de manière à former une colonne montante. Les bassins sont placés sur huit tables d'une hauteur de 74 cm, à raison de deux par table. Le tuyau d'évacuation traverse la colonne montante, se raccorde aux canalisations en dessous et à la conduite principale qui rejette l'eau dans la rivière, en aval du point de prise d'eau.

Pour les études sur les invertébrés, le courant dans chaque bassin est créé à l'aide d'un système à hélices actionné par courroie, lequel est relativement doux sur les organismes en suspension (figure 4) (Podemski, 1999). Le groupe-moteur dans chaque bassin est constitué d'un moteur à engrenages (250 T/M, 1/40 A) qui entraîne une poulie de 22,6 mm. La puissance du moteur est transmise à une poulie de 49,3 mm montée sur l'arbre de transmission, au moyen d'un entraînement par courroie. Le moteur et les composantes électroniques connexes sont montés sur un cadre d'aluminium, placé à l'intérieur d'une enceinte étanche et fixé à l'aide de brides au bord supérieur (extérieur) du bassin. Un support de cuivre de 16 x 230 mm de longueur, qui s'étend vers le bas à partir du cadre d'aluminium, maintient la garniture d'étanchéité et la bague de graissage de l'arbre de transmission. La lubrification de l'arbre de transmission et de la garniture d'étanchéité se fait à l'aide d'un bouchon graisseur qui se trouve à l'extrémité de ce tube. L'hélice (une par bassin) consiste en une pale de ventilateur d'aluminium de 23 cm (9 po) de diamètre, qui tourne à une vitesse à vide de 115 T/M. La vitesse d'écoulement dans chaque bassin, à mi-hauteur environ de la colonne d'eau, est normalement maintenue à 20 cm/s; la vitesse doit toutefois être déterminée en fonction des conditions propres à chaque site. Il existe également d'autres mécanismes générateurs de courant qui peuvent être utilisés, à la condition qu'ils produisent la vitesse désirée. Ce système d'hélices peut aussi servir pour les études sur le poisson, bien que des rampes d'arrosage fixées au système d'alimentation en eau de chaque bassin aient aussi été utilisées dans le cadre d'études sur des espèces pour lesquelles la vitesse de l'eau n'était pas un facteur déterminant.

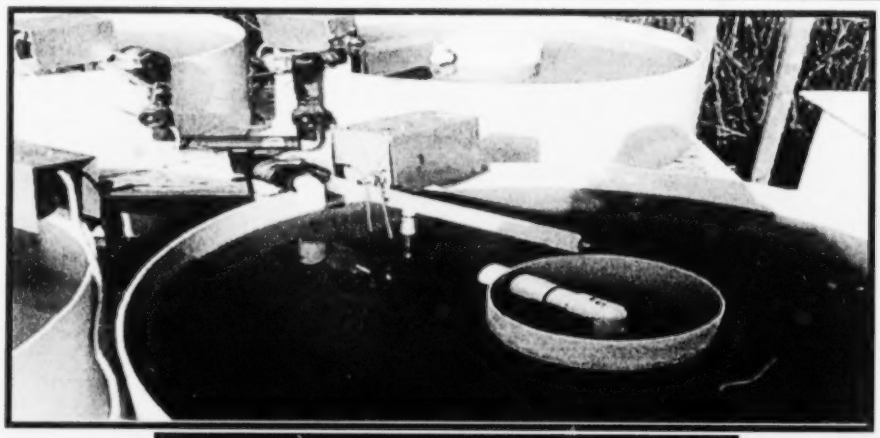
A



B

C

Figure 11-3 A) Mésocosme
B) Tuyau de trop-plein dans le système de mésocosmes
C) Tuyau de trop-plein grillagé dans le système de mésocosmes



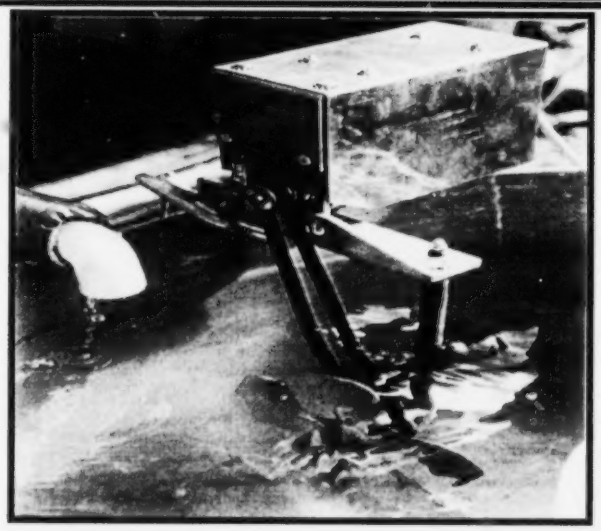


Figure 11-4: Pale de ventilateur servant à maintenir la vitesse du courant

Les échantillons d'effluent sont prélevés chaque jour ou tous les deux jours et sont conservés dans des contenants de polyéthylène. Le site de prélèvement dépend du plan de l'étude. Dans le cas, par exemple, d'une étude de suivi initial sur une usine de pâtes, il faut analyser l'effluent final représentatif de ce qui est rejeté dans le milieu aquatique. L'introduction des effluents dans chaque bassin se fait de manière indépendante et continue, à l'aide de pompes péristaltiques (têtes de pompe à cartouches et contrôleurs d'écoulement L/S Masterflex® L/S, type Nema 13) et d'une série de tuyaux isolés servant à l'introduction de la solution. Les pompes péristaltiques peuvent être placées à l'intérieur de boîtiers isolés pour maintenir la température à l'intérieur de la fourchette des températures de fonctionnement approuvées. Les tuyaux servant au transport de l'effluent peuvent être glissés à l'intérieur de tuyaux recouverts de mousse isolante, puis raccordés au conduit d'alimentation en eau de chaque bassin. Le débit de l'effluent varie en fonction des concentrations environnementales propres au site à évaluer. À titre d'exemple, si les études sur la délimitation du panache menées sur le terrain ont révélé que la concentration de l'effluent était de 1 %, alors le débit dans chaque bassin doit être réglé à 20 mL/min (1 % de 2 L/min). Si la remorque compte 16 bassins répartis entre deux traitements (8 bassins témoins; 8 bassins d'analyse d'une concentration de 1 %), on calculera comme suit le volume d'effluent requis sur une base quotidienne : 20 mL/min x 60 min/h x 24 h/j = ~29 L/j/bassin x 8 bassins = ~231 L/j. Ce volume pourrait être contenu à l'intérieur d'un petit contenant de polyéthylène.

Après avoir étalonné les débits d'eau et d'effluent pour chaque système, on procède à l'ensemencement de chaque bassin en y introduisant le substrat naturel, les algues, les invertébrés benthiques et/ou les espèces de poissons endémiques du milieu récepteur à l'étude. Nous décrivons ci-après les méthodes d'ensemencement du biote, pour les poissons et les invertébrés. Pour obtenir plus d'informations sur la construction du système sur remorque, contacter Joseph Culp (joseph.culp@ec.gc.ca) ou Monique Dubé (monique.dube@ec.gc.ca), de l'Institut national de recherche sur les eaux, Environnement Canada, 11 Innovation Blvd., Saskatoon (Saskatchewan) S7N 3H5.

11.1.5 Facteurs à considérer pour le choix du site

Il y a certaines exigences de base à respecter pour l'exploitation du système de mésocosmes. Le système est habituellement installé dans une zone de référence qui donne accès à de l'eau de référence. Si l'étude porte sur une rivière, l'eau de référence doit être puisée en amont du point de rejet de l'effluent dans le milieu et doit être rejetée dans la rivière, en aval du point de prélèvement. Il s'agit du scénario le plus simple pour l'usage de mésocosmes. Si le système de mésocosmes est utilisé en milieu marin ou estuarien, on choisira le site de manière à s'assurer que l'eau de référence n'est pas contaminée par l'effluent sous l'effet des marées, la contamination pouvant être causée par l'effluent rejeté par l'usine ou par l'effluent provenant du système de mésocosmes (c.-à-d. débit sortant des bassins). Dans le premier cas, les études sur la délimitation du panache sont utiles pour déterminer la zone à l'intérieur de laquelle l'effluent exerce un effet dans le milieu récepteur et ainsi choisir un site de référence approprié, qui se trouve à l'extérieur de cette zone d'effet (voir Environnement Canada, 1998; 2001). Dans le dernier cas, le mésocosme peut être situé sur une digue, une flèche ou un quai, pour s'assurer que le débit sortant du mésocosme ne contamine pas le débit entrant.

Les mines sont souvent situées sur le cours supérieur de la rivière; les zones de référence adéquates peuvent donc se trouver à une distance appréciable du lieu de la mine, en particulier en régions éloignées. De plus, les effluents miniers sont habituellement beaucoup plus concentrés

que les effluents des usines de pâtes et papiers, de sorte que les exigences qui s'appliquent aux effluents sont supérieures à celles relatives à l'eau de référence. Le cas échéant, le système de mésocosmes peut être installé sur les lieux de la mine et on peut transporter et stocker l'eau de référence. On peut également utiliser les installations de plomberie de la remorque pour introduire l'effluent et les pompes péristaltiques, pour l'eau de référence.

La distance par rapport à la source d'eau de référence est un autre facteur à considérer dans le choix du site, car des besoins de pompage élevés, imputables à la distance de pompage ou à la charge hydraulique (hauteur de chute), risquent d'être supérieurs aux caractéristiques de la pompe, laquelle ne pourra pas générer le débit requis. Parmi les autres points à considérer, mentionnons la présence d'un espace suffisant, la facilité d'accès au site, les sources d'alimentation en énergie et la sécurité. Il faut un terrain plat et bien drainé, d'une superficie de 9 x 5 m, pour y installer le système sur remorque. L'accès à une source d'énergie est un des principaux critères qui influent sur le choix du site. Le système décrit ici requiert une alimentation de 120 A/115 V, pour alimenter la pompe d'admission, les générateurs de courant, les pompes à air, etc. L'usine de pâtes répond habituellement à ce besoin en ajoutant un coffret de branchement au réseau électrique déjà en place. En régions éloignées, des génératrices ont été utilisées pour alimenter le système en l'absence de source d'énergie, mais cette approche n'est pas recommandée car l'entretien et la surveillance des génératrices risquent de rendre le coût de cette méthode prohibitif.

Après avoir choisi le site pour l'étude en mésocosmes, la remorque est amenée sur les lieux et branchée aux sources d'alimentation en eau et en énergie. Il est important de bien orienter la remorque afin de réduire au minimum les variations entre les bassins dues à la quantité d'éclairement et à l'exposition au vent. Un des principaux avantages du système de mésocosmes réside dans le fait que l'exposition du biote aux effluents se fait dans des conditions comparables aux conditions environnementales, pour ce qui est de la température ambiante, de la qualité de l'eau et de l'intensité lumineuse. Dans la mesure du possible, il est recommandé d'orienter la remorque dans un axe nord-sud, c'est-à-dire perpendiculairement au lever et au coucher du soleil. Il faut aussi éviter d'exposer la remorque aux effets d'ombrage créés par les bâtiments ou autres installations situés à proximité (c.-à-d. la durée et la qualité d'ensoleillement devraient être identiques pour tous les bassins).

11.1.6 Plans d'études de suivi biologique

11.1.6.1 Vue d'ensemble

Le plan d'étude doit préciser les études en mésocosmes et les analyses de laboratoire connexes qui seront réalisées pour compléter le volet du programme d'ESEE axé sur le suivi biologique. Bon nombre des composantes de l'étude sont similaires à celles définies dans les Guides techniques pour les enquêtes sur le terrain (Environnement Canada, 1998, 2001).

Avant de procéder à une étude de suivi biologique, l'usine doit soumettre un plan d'étude à l'agent d'autorisation, au moins six mois avant le début du programme de suivi biologique. Ce plan doit préciser ce qui suit :

- calendrier détaillé des différentes étapes de l'étude en mésocosmes;

- description de la zone à l'étude;
- description des études sur le poisson qui seront menées pour déterminer la présence ou non d'effets sur la population de poissons et les tissus;
- description de la manière dont seront réalisées les études visant à déterminer la présence ou non d'effets sur la communauté d'invertébrés benthiques, ceci devant servir d'indicateur des effets sur l'habitat du poisson, et
- description des mesures d'assurance de la qualité et de contrôle de la qualité prévues pour assurer la validité des données.

Parmi les autres données qu'il est recommandé d'inclure dans le plan d'étude, mentionnons les suivantes :

- définition des buts et des objectifs de l'étude d'ESEE;
- description de la démarche globale, y compris les raisons à l'appui de l'utilisation d'une méthode alternative (on peut s'appuyer sur les résultats d'études de suivi antérieures);
- définition des critères à l'appui du protocole statistique : formulation des hypothèses, choix des méthodes statistiques, détermination des besoins en matière de données (analyse de la signification et de la puissance statistiques);
- description du plan de l'étude de suivi : lieu d'échantillonnage, paramètres à mesurer, nombre d'échantillons;
- élaboration des plans et des procédures de fonctionnement : procédures d'échantillonnage, protocole d'analyses en laboratoire, méthodes d'assurance de la qualité et de contrôle de la qualité, stockage et extraction des données, analyse des données, et
- description d'un plan pour l'interprétation des données et l'évaluation du programme.

Les concepts et les éléments de base d'un bon système de mesure et d'un bon programme d'assurance et de contrôle de la qualité (AQ/CQ) sont définis dans Environnement Canada (1998, 2001). Les méthodes d'AQ/CQ doivent être définies dans le plan d'étude, avant le début de l'étude, et chaque rapport d'interprétation doit faire mention de tous les résultats des analyses d'assurance de la qualité, qui sont susceptibles d'avoir une incidence sur la fiabilité des conclusions.

11.1.7 Traitements à l'étude

Lors d'études en mésocosmes, les effets de l'effluent sur le poisson sont évalués en comparant les poissons sous conditions de contrôle (eau de référence) aux poissons exposés aux effluents, en regard de différents indicateurs de la population (croissance, reproduction, état et survie). Dans le cas des effluents des pâtes et papiers, les effets peuvent aussi être évalués en comparant le taux de dioxines et furannes dans les tissus des poissons témoins et exposés. Pour l'étude des invertébrés benthiques, l'effet est déterminé en comparant les mesures sur la densité de la communauté, la richesse des taxons, l'indice de diversité de Simpson et l'indice Bray-Curtis, entre les invertébrés benthiques du milieu témoin et les invertébrés exposés. Il est essentiel que les études en mésocosmes soient conçues de manière à maximiser la possibilité de déceler les effets, s'il en est, et qu'elles soient réalisées à l'aide d'un *modèle de mésocosmes dont l'usage a été approuvé par Environnement Canada*. Il importe également de choisir avec soin les traitements, le niveau de répétition, les espèces-sentinelles et les mesures terminales et de réaliser les études à la bonne période de l'année.

Plusieurs plans d'étude peuvent être utilisés, selon les exigences propres au site . Le système de mésocosmes à bassins multiples offre la latitude nécessaire pour tenir compte des aspects propres au site dans le plan d'étude d'ESEE; les 16 bassins permettent en effet d'étudier simultanément un maximum de trois traitements différents (le traitement devant être répété sur cinq bassins) dans des conditions d'exposition réalistes sur le plan environnemental. Un plan d'étude contrôle/impact peut être utilisé lorsqu'on veut uniquement comparer le biote (invertébrés benthiques ou poisson) contrôle au biote exposé à un effluent dont la concentration se compare à celle observée dans l'environnement (c.-à-d. référence contre exposé). Pour déterminer cette concentration réaliste sur le plan environnemental, il est recommandé de se baser sur une étude de délimitation du panache réalisée durant l'étude de pré-conception; la concentration doit être représentative de l'effluent rejeté dans la zone rapprochée, après mélange complet (Environnement Canada 1998, 2001). Le plan contrôle/impact pour une étude sur le poisson consiste habituellement à répartir les poissons adultes (20 mâles et 20 femelles à maturité sexuelle) et juvéniles (20 poissons non mûrs) d'une espèce-sentinelle de petite taille dans chaque bassin (huit bassins par traitement). Les invertébrés benthiques sont ensemencés dans le système, conformément aux densités ambiantes observées dans la zone de référence du principal habitat.

Dans certains cas, des traitements additionnels pourraient être voulus. Les plans d'étude basés sur la relation dose-effet, qui prévoient l'utilisation d'un autre effluent plus concentré, sont utiles pour confirmer la sensibilité du biote et l'absence d'effets. Dubé et MacLatchy (2000), par exemple, ont utilisé trois traitements (témoin contre 1 % contre 5 %) pour évaluer les effets de l'effluent final rejeté par une usine de pâte kraft blanchie sur un cyprinodontidé d'eau salée, le choquemort (*Fundulus heteroclitus*). Lors de cette étude, les chercheurs n'ont observé aucun effet à la concentration environnementale (1 %), mais des effets ont été décelés à une concentration de 5 %. Ce plan s'est donc révélé d'une valeur inestimable pour démontrer que le poisson peut réagir à l'effluent et que l'absence d'effets à une concentration de 1 % est bien réelle et qu'elle n'est pas imputable à la courte durée d'exposition durant les études. De même, Culp *et al.* (2000) ont utilisé trois traitements (témoin, 1 % et 5 %) pour évaluer les effets de l'effluent d'une usine de pâte kraft blanchie sur les réseaux trophiques benthiques.

D'autres traitements pourraient aussi être souhaitables lorsque plusieurs fabriques rejettent leurs effluents dans la même zone d'échantillonnage. Le cas échéant, chaque rejet peut représenter un traitement d'exposition dans le protocole expérimental et les effets de chaque effluent peuvent être examinés, séparément ou globalement. À titre d'exemple, si une fabrique rejette trois effluents dans le même plan d'eau récepteur, les effets de ces effluents peuvent être évalués au moyen des traitements suivants : témoin, effluent 1 (concentration caractéristique de l'environnement), effluent 2, effluent 3, effluent 1+2+3 (concentration caractéristique de l'environnement). Dans ce dernier exemple, le nombre de bassins par traitement serait réduit à trois.

11.1.8 Répétition

Le niveau de répétition approprié, pour les études en mésocosmes, a fait l'objet de nombreuses discussions. Dans le cas des études sur les invertébrés benthiques, chaque bassin représente l'unité de répétition des paramètres mesurés au niveau de la communauté. Donc, dans un protocole contrôle/impact prévoyant l'étude de deux traitements (référence contre exposition), n = 8 car le système de mésocosmes comprend 16 bassins. Le nombre de traitements à l'étude peut être plus élevé (voir ci-après) mais, aux fins du programme d'ESEE, chaque traitement doit

être répété au moins cinq fois pour obtenir la puissance statistique nécessaire à l'évaluation des effets, lorsque le bassin est l'unité de répétition et qu'il n'existe aucune donnée de surveillance préalable. Cette approche est conforme avec la méthode recommandée pour déterminer le nombre de stations d'échantillonnage, d'après la puissance statistique des plans d'étude sur le terrain (Environnement Canada, 1998; 2001).

L'unité de répétition est moins évidente lorsqu'on veut utiliser le système pour mesurer des résultats au niveau individuel, chez le poisson. Il faut alors quantifier l'importance de l'effet imputable au bassin (*c.-à-d.* l'effet d'un bassin par rapport à un autre, à l'intérieur d'un même traitement). Dans bon nombre d'études en laboratoire pour lesquelles les poissons sont placés dans un aquarium, on présume qu'il n'y a pas de raison biologique pour qu'il y ait des différences entre les bassins et donc toutes les mesures individuelles d'un même traitement sont mises en commun (*c.-à-d.* qu'on ignore souvent la variabilité imputable à l'effet du bassin). Dans le cas toutefois des études en mésocosmes, nous croyons qu'un effet de bassin peut exister et qu'il faut tenir compte de la variation imputable à cet effet dans le plan statistique, et plus particulièrement dans le cas d'expositions à plus long terme (p. ex., 60 jours). On pourrait alors procéder à une analyse de la variance à plusieurs degrés, où l'effet du bassin étant niché dans le facteur à effet fixe (traitement). S'il existe un effet de bassin, le niveau de répétition devrait être le bassin. S'il n'existe pas d'effet de bassin, le poisson peut être choisi comme unité de répétition et tous les résultats d'un même traitement peuvent être mis en commun, ce qui aura pour effet d'augmenter sensiblement le nombre de répétitions. Pour les analyses de régression (analyse de covariance), il est probable que toute différence entre les bassins apparaîtra comme une variable aberrante dans l'analyse. La section 11.1.10.5.2 présente une description du plan statistique recommandé pour le poisson.

11.1.9 Tailles des l'échantillons et rôle de la taille de l'effet

11.1.9.1 Absence de données préalables (historiques)

Pour les études en mésocosmes sur les invertébrés benthiques, la taille de l'échantillon correspond au nombre de bassins répétés par traitement, puisque le bassin est l'unité de répétition. Dans un plan contrôle/impact, on utilise huit bassins (répétitions) par traitement. Le nombre de traitements à l'étude peut être plus élevé, mais il doit y avoir au moins cinq répétitions ou échantillons par traitement, pour satisfaire au critère de puissance en l'absence de données préalables (voir ci-après). Chaque échantillon correspond à la moyenne des sous-échantillons prélevés de chaque bassin.

En l'absence de données de suivi de base, l'échantillon minimal recommandé pour une enquête type sur le terrain est de 20 mâles et 20 femelles parvenus à maturité sexuelle de deux espèces de poisson prélevés de la zone de référence et de la zone d'exposition. Si l'une ou les deux espèces sont des poissons de petite taille, 20 poissons sexuellement immatures devraient aussi être prélevés. Cette décision d'utiliser 20 poissons de chaque sexe s'appuie sur le fait que les limites de confiance au seuil de 95 % varient peu au-delà de 20 poissons.

La démarche actuelle, pour les études en mésocosmes, consiste à répartir de 15 à 20 mâles et de 15 à 20 femelles sexuellement matures d'une espèce-sentinelle de petite taille dans chaque bassin et d'y ajouter de 20 à 30 poissons juvéniles par bassin. Il s'agit de la taille recommandée pour les

échantillons, laquelle peut être augmentée ou réduite selon l'espèce sélectionnée, la puissance statistique du plan d'étude et la variabilité du poisson. Si le bassin est l'unité de répétition choisie pour un traitement, alors le recours à 20 poissons de chaque sexe par bassin permet d'obtenir une moyenne d'un bon degré de précision (c.-à-d. les limites de confiance à 95 % varient peu au-delà de 20 poissons). S'il n'y a pas d'effet de bassin et que les termes d'erreurs sont combinés de manière à ce que le poisson devienne l'unité de répétition, on obtiendra un niveau de répétition beaucoup plus élevé en utilisant de 15 à 20 poissons de chaque sexe par bassin, pour chaque traitement. Dans le cas par exemple d'un plan d'étude ayant pour but de comparer un témoin à un effluent d'une concentration de 1 % en utilisant huit bassins par traitement, l'utilisation de 20 mâles, 20 femelles et 20 juvéniles par bassin peut donner en fait 160 mâles, 160 femelles et 160 juvéniles par traitement, si le poisson est l'unité de répétition.

11.1.9.2 Données préalables (historiques) disponibles

Lorsque des données sont disponibles, on peut calculer la taille de l'échantillon requis pour mesurer l'ampleur de l'effet dans un paramètre donné au niveau de puissance statistique visé, car on connaît la variabilité d'échantillonnage. Ainsi, il faudra utiliser un grand nombre d'échantillons si les paramètres sont très variables, si l'on cherche à déceler de petites différences entre les échantillons témoins et exposés (faible ampleur de l'effet) ou si l'on veut obtenir un niveau de puissance élevé. Pour déterminer la taille de l'échantillon à partir des données existantes, il faut d'abord déterminer l'ampleur de l'effet et le niveau de puissance statistique acceptables aux fins du processus de prise de décisions, cette étape ayant pour but d'établir à quel moment le programme d'échantillonnage fournit suffisamment de données pour étayer la prise de décisions. La taille de l'échantillon peut être calculée à partir des méthodes définies dans Environnement Canada (2001). L'annexe 1 du document publié par Environnement Canada (1997) décrit en détail les rapports de puissance, l'ampleur de l'effet et les avantages de réduire la variabilité en augmentant la puissance. Pour calculer la puissance, il est recommandé de fixer les valeurs de α et β à 0,10, tel que défini dans EC (2001).

La variabilité d'échantillonnage est le principal facteur qui influe sur la puissance statistique. En général, la variabilité est moindre lors des études en mésocosmes que des études sur le terrain, car l'exposition est contrôlée et les traitements sont répétés. Les études en mésocosmes sont conçues en fonction du site et il faut chercher principalement à réduire la variabilité plutôt qu'à augmenter la taille de l'échantillon. On peut réduire la variabilité en répartissant de façon aléatoire les bassins entre les traitements, ainsi que le biote (invertébrés benthiques et poisson) entre les bassins, conformément au protocole défini aux sections 11.1.10.4.1 et 11.1.11.4.1. L'échantillonnage aléatoire à la fin de la période d'exposition contribue également à réduire la variabilité, car il évite de prélever tous les échantillons d'un même traitement en même temps (p. ex., tous les échantillons témoins le jour 1 et les échantillons exposés le jour 2). Parmi les autres mesures visant à réduire la variabilité, mentionnons le choix de la période appropriée pour l'étude, la sélection des espèces et l'application de mesures d'AQ/CQ aux protocoles d'échantillonnage et d'analyse. De plus, dans le cas des études sur le poisson, on choisit habituellement des poissons d'une catégorie de taille uniforme pour chaque bassin, là encore pour réduire la variabilité. Cependant, l'utilisation d'espèces de petite taille, notamment de géniteurs, peut accroître la variabilité en raison des différences dans les conditions de frai entre les différents sujets, au moment de l'étude. Enfin, l'utilisation d'échantillons tissulaires composites pour l'analyse des paramètres chimiques peut accroître la variabilité d'échantillonnage, si le nombre de composites par bassin est faible.

11.1.10 Étude de suivi des poissons – Évaluation des effets

11.1.10.1 Plan d'étude

11.1.10.1.1 Choix d'espèces

Les principaux facteurs qui influent sur le choix des espèces de poisson pour les études en mésocosmes sont la pertinence de l'espèce en regard du milieu à l'étude, l'abondance de l'espèce aux fins de l'échantillonnage, la disponibilité d'adultes et de juvéniles, le dimorphisme sexuel, la période du frai et la sensibilité de l'espèce à l'effluent. Les ressources locales peuvent fournir des renseignements utiles sur les espèces de poisson ou sur les lieux d'échantillonnage appropriés. La méthode recommandée pour évaluer les effets d'un effluent lors d'études en mésocosmes consiste à surveiller les adultes avant la période du frai (poissons sexuellement matures), ainsi que les juvéniles d'une espèce de petite taille (p. ex., dards, vairons, chabots) présents dans le milieu récepteur. Le suivi des adultes permet d'évaluer les effets de l'effluent sur la survie, la consommation d'énergie (paramètres liés à la reproduction) et le stockage d'énergie (c.-à-d. état et taille du foie). De même, le suivi des juvéniles renseigne sur les effets de l'effluent sur la survie, la consommation d'énergie (c.-à-d. croissance comme substitut de la taille selon l'âge) et le stockage d'énergie (c.-à-d. taille du foie et état).

Les avantages et les inconvénients liés à l'utilisation d'espèces de petite taille pour les études sur le terrain sont décrits dans Gibbons *et al.* (1998a, 1998b), un poisson de petite taille faisant référence à une espèce mesurant au plus 150 mm. On peut trouver de l'information sur la croissance maximale des espèces de poisson dans la documentation scientifique, notamment dans Scott, 1967; Scott et Crossman, 1973; Fritz *et al.*, 1975; Roberts, 1988; Nelson et Paetz, 1992; Jenkins et Burkhead, 1993; Coad, 1995; Leblanc et Couillard, 1995 et Leblanc *et al.*, 1998. Pour sa part, Shuter (1990) note que les espèces de petite taille sont plus sensibles à l'acidification que les espèces plus grosses ou, tout au moins, qu'elles réagissent plus rapidement aux variations du pH. Sur le plan pratique, les espèces de petite taille sont habituellement plus abondantes, plus faciles à capturer et plus sédentaires que les espèces plus grosses. Il est en outre possible d'obtenir des mesures précises et exactes sur les espèces de petite taille.

Cependant, l'utilisation de poissons de petite taille peut aussi comporter des inconvénients. Ainsi, on en connaît souvent moins sur leur biologie de base, en particulier sur leurs habitudes de frai, d'où la difficulté de déterminer les meilleures zones, périodes et méthodes d'échantillonnage. De plus, certaines espèces sont des reproducteurs à pontes multiples (plus d'une ponte d'œufs matures par année) (Heins et Rabito, 1986; Burt *et al.*, 1988; Paine, 1990), ce qui peut être un inconvénient pour les études sur le terrain, car il est difficile d'estimer l'effort de reproduction chez ces espèces à partir d'un seul échantillon. Il peut y avoir renouvellement presque complet des tissus reproducteurs entre les pontes (c.-à-d. il y aura ponte de la majeure partie de la masse d'œufs produite dans l'ovaire, puis formation d'une nouvelle masse d'œufs matures). Le nombre de pontes durant la saison de frai devient la variable de reproduction déterminante, qu'il est toutefois difficile d'estimer pour une femelle donnée sur le terrain, même en procédant à de fréquents échantillonnages. Malgré tout, des poissons à pontes multiples comme le choquemort (*Fundulus heteroclitus*) ont été utilisés avec succès dans des études en mésocosmes visant à

évaluer les effets d'un effluent sur les mesures terminales d'ESEE, y compris sur la taille des gonades (Dubé et MacLatchy, 2000; Dubé *et al.*, 2001a, 2001b). Un des avantages des études en mésocosmes avec exposition contrôlée est qu'il est possible de surveiller l'état des reproducteurs à ponte fractionnée tout au long de la période d'exposition.

Le système de mésocosmes offre suffisamment de latitude, non seulement pour évaluer les effets des effluents sur une espèce unique de poisson de petite taille, mais aussi pour surveiller deux espèces de poisson de petite taille ou des juvéniles de poisson de grande taille. En théorie, des poissons de grande taille pourraient aussi être étudiés en mésocosmes, mais cette approche n'a pas encore été utilisée. La sélection des espèces pour les études en mésocosmes est limitée par des facteurs reliés à la taille (le nombre de poissons par bassin diminue à mesure qu'augmente la taille), au nombre de traitements à l'étude (l'augmentation du nombre de traitements réduit le nombre de bassins répétés par traitement et limite le nombre de poissons pouvant être surveillés) et au dimorphisme sexuel (s'il est impossible de distinguer les mâles des femelles par leur apparence, il faut en utiliser davantage pour s'assurer que la taille de l'échantillon est suffisante). Enfin, les espèces échantillonnées doivent convenir à l'évaluation des variables recommandées. Les espèces de poisson qui ont été utilisées jusqu'à maintenant pour des études en mésocosmes incluent le choquemort (*Fundulus heteroclitus*), le saumon atlantique juvénile (*Salmo salar*) et le chabot visqueux (*Cottus cognatus*). D'autres espèces ont été proposées pour des études en 2001 et 2002, soit le mulet à cornes (*Semotilus atromaculatus*), la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), le naseux de rapides (*Rhinichthys cataractae*) et la tête-de-boule (*Pimephales promelas*).

11.1.10.2 Mesures terminales biologiques

Les paramètres mesurés sur le poisson sont les mêmes, que l'étude soit menée sur le terrain ou en mésocosmes. Pour déterminer si l'effluent a une incidence sur la population de poissons, on évalue ses effets sur la croissance, la reproduction, l'état et la survie de la population. La survie, la consommation d'énergie (croissance et reproduction) et le stockage d'énergie (état, taille du foie) sont des mesures qui peuvent permettre de déceler un effet relié à l'effluent, et toutes ces mesures peuvent être prises sur des poissons exposés aux effluents dans le cadre d'études en mésocosmes.

La croissance fait référence aux variations dans la taille (poids ou longueur) en fonction du temps ou de l'âge. Les études en mésocosmes menées sur une période d'exposition plus longue (45 à 60 jours) peuvent évaluer les effets de l'effluent sur la croissance des juvéniles, et plus particulièrement les changements dans le poids corporel total et la longueur par rapport aux poissons témoins. Pour les études en mésocosmes, la croissance est mesurée chez les jeunes de l'année ou les juvéniles, du début à la fin de l'étude, soit pendant six à huit semaines selon la température durant l'étude. Cette méthode donne une mesure plus directe des effets sur la croissance que les estimations de la taille selon l'âge qui sont faites dans les enquêtes sur le terrain. Si les effets sur la croissance doivent être déterminés à partir d'une période d'exposition plus courte, les études doivent alors être réalisées lorsque la température de l'eau est chaude, sur une espèce-sentinelle à taux de croissance élevé. Kneib et Stiven (1978) ont démontré que les juvéniles du choquemort, par exemple, ont un taux de croissance très élevé après l'éclosion (gain de 15 mm en deux mois), ce qui en fait une espèce idéale pour évaluer les effets d'un effluent sur la croissance. Selon des études plus récentes réalisées sur des jeunes de l'année du chabot visqueux, les effets sur la croissance peuvent être mesurés après 26 jours seulement d'exposition aux effluents (Culp, Cash, Dubé, Glozier, MacLatchy, inédit). On peut améliorer les mesures sur

la croissance des juvéniles en marquant les sujets (par la coupe des nageoires, des taches d'encre ou le marquage) pour en déterminer la longueur et le poids. Le suivi du taux de croissance de sujets particuliers réduit la variabilité des mesures et, donc, facilite l'évaluation des effets. La croissance peut aussi être mesurée à intervalles réguliers, tout au long de l'étude. Et bien que l'on mesure également la longueur et le poids des adultes, il est peu probable que les sujets adultes grossissent pendant la courte durée des études en mésocosmes.

La reproduction peut être exprimée en fonction de l'effort de reproduction, de la fécondité, de la taille des œufs ou du poids des gonades par rapport à la taille corporelle. Jusqu'à maintenant, les effets des effluents sur la fonction reproductrice ont été évalués, en mésocosmes, en fonction des variations dans la taille des gonades. La fécondité et la taille des œufs sont également faciles à mesurer lorsque la période d'échantillonnage est choisie avec soin. Idéalement, les études d'exposition devraient commencer de six à huit semaines avant le frai, pour évaluer les effets de l'effluent sur le poids des gonades.

L'état physique du poisson est également évalué durant une étude en mésocosmes et peut servir d'indice du bien-être et doit être déclaré. Il est ainsi recommandé de faire une estimation visuelle des malformations physiques, y compris des lésions à la surface du corps comme les nageoires érodées, effilées ou qui saignent, la présence de parasites ou autres malformations physiques.

11.1.10.3 Période et durée de l'exposition aux effluents

Il est important de choisir avec soin la période de l'étude en mésocosmes, en tenant compte du cycle de frai de l'espèce de poisson. Idéalement, pour les reproducteurs du printemps, les études commenceront de six à huit semaines avant le début du frai. Si l'espèce fraie tôt au printemps et donc qu'il est impossible de l'étudier aussi longtemps avant la période du frai, les études doivent être menées le plus tard possible durant l'année pour permettre la sénescence et recrudescence des gonades. Pour les reproducteurs de l'automne, l'étude peut être menée au printemps ou à l'été, sauf peut-être pour les espèces dont les œufs arrivent à maturité rapidement. Par exemple, certains cyprins qui fraient à la fin du printemps devraient être étudiés au début du printemps, plutôt qu'à l'automne, lorsque leurs œufs peuvent encore être immatures. La température de l'eau est un autre facteur à considérer pour déterminer la période de l'étude si le taux de croissance des juvéniles augmente durant les mois d'été. Enfin, s'il existe des données historiques, il serait utile de les examiner et, s'il y a lieu, de mener l'étude à une période similaire afin de pouvoir comparer les résultats. De même, les études de suivi subséquentes devraient être réalisées à la même période de l'année, pour être comparables.

Les études en mésocosmes doivent être suffisamment longues pour mesurer les changements dans les mesures terminales exigées, tout en étant assez courtes pour être rentables. Des périodes d'exposition de 30 jours durant l'été et l'automne ont été utilisées pour mesurer les changements dans la taille des organes adultes (taille du foie et des gonades) et le taux de croissance des jeunes de l'année du chabot visqueux, après exposition à un effluent. Des périodes d'exposition plus longues (50 à 60 jours) sont recommandées pour évaluer les paramètres chez les adultes et les variations dans la croissance des juvéniles. Il n'est toutefois pas jugé rentable de prolonger la période d'exposition au-delà de 60 jours, à moins d'adopter des mesures de réduction des coûts (p. ex., embaucher un étudiant durant l'été pour assurer le suivi du système durant l'étude).

Enfin, toutes les études en mésocosmes devraient être réalisées durant les périodes d'exploitation normales de l'entreprise. Durant l'étude, les effluents sont prélevés tous les jours ou tous les deux jours et devraient être représentatifs des effluents rejetés durant les conditions normales d'exploitation. Il importe par ailleurs d'éviter de stocker des effluents, par exemple durant une période de transition où l'on passe de la production de bois dur au bois mou, ou durant les périodes de fermeture des usines de blanchiment. De plus, les études devraient être menées lorsque l'usine utilise une source d'approvisionnement uniforme (c.-à-d. la moitié de l'étude ne doit pas être réalisée pendant le traitement de résineux et l'autre moitié, durant le traitement de feuillus). De même, les études en mésocosmes dans les fabriques ne devraient pas être menées s'il n'y a pas eu de rejet d'effluent pendant une longue période (mois), ni durant une période de perturbation du système de traitement des eaux usées.

11.1.10.4 Méthodologie relative au poisson

11.1.10.4.1 Installation générale

Après que le système de mésocosmes a été amené sur les lieux de l'étude et qu'il a été branché aux réseaux d'alimentation en eau de référence et en électricité, on procède à l'introduction du substrat dans les bassins, ainsi qu'à l'étalonnage du débit d'eau et de la vitesse du courant dans les bassins, tel que décrit précédemment. Selon les caractéristiques du substrat propre au site, du gravier concassé ou du sable lavé peut être ajouté dans chaque bassin, sur une couche de 5 cm. Lors d'études précédentes, de grosses roches lavées ont aussi été ajoutées dans chaque bassin pour servir de refuge au poisson.

Le poisson est prélevé d'une zone de référence, non exposée à l'effluent à l'étude. La collecte doit bien sûr se faire par des méthodes de prélèvement non létales, par exemple à l'aide de pièges à vairons ou de trappes en filet ou par la pêche à l'électricité avec filets de retenue. Ces techniques sont décrites en détail dans les guides techniques publiés par Environnement Canada (1995b, 1998, 2001). Le poisson est habituellement trié sur le terrain pour s'assurer que l'on a prélevé un nombre suffisant de juvéniles, ainsi que d'adultes de chaque sexe (si l'espèce est dimorphe), et que le poisson recueilli est de taille similaire. Si l'espèce choisie n'est pas sexuellement dimorphe, on suppose que les sex-ratios sur le terrain sont égaux et le poisson est réparti de façon aléatoire entre les bassins. On peut aussi prélever un sous-échantillon de ces poissons et les disséquer pour en déterminer la répartition par sexe, si l'on veut plus d'informations. Les poissons sont transportés à la zone d'étude dans des contenants munis de couvercles et suffisamment aérés. Si aucune zone de référence n'est disponible, des poissons d'élevage peuvent être utilisés si l'espèce est présente dans la zone à l'étude.
Sur les lieux de l'étude – de préférence le même jour – les poissons sont mesurés (longueur et poids) et marqués au besoin, puis sont répartis de façon aléatoire entre les bassins. Le degré de précision des mesures doit être conforme aux exigences définies dans les guides techniques d'Environnement Canada (1995b, 1998, 2001), le niveau de précision étant plus élevé pour les espèces de petite taille. Le nombre optimal de poissons par bassin est de 20 adultes de chaque sexe et de 30 juvéniles. Pour assurer une répartition aléatoire des poissons entre les bassins, on installe 16 seaux aérés contenant de l'eau de référence. Chaque poisson est mesuré puis est déposé dans un des seaux, jusqu'à ce que chaque seau contienne un poisson. Cette procédure est répétée jusqu'à ce que tous les seaux renferment chacun cinq poissons. Les seaux sont alors répartis de façon aléatoire entre les bassins, et la procédure est répétée jusqu'à ce que l'on ait

atteint le nombre voulu d'échantillons par bassin. Il est essentiel de suivre cette procédure pour s'assurer, par exemple, que les poissons les plus gros ne se retrouvent pas tous dans les premiers bassins.

La répartition des poissons peut se faire selon l'un des deux scénarios suivants (figure 5). Les adultes et les juvéniles peuvent être placés dans les mêmes bassins, si le taux de croissance des juvéniles est déterminé uniquement en fonction de la longueur et du poids mesurés au début et à la fin de l'étude et que les adultes ne sont pas cannibales (figure 5a). Cependant, si le taux de croissance des juvéniles doit être évalué tout au long de l'étude (par exemple, les juvéniles sont marqués en vue de la prise de mesures répétées durant l'étude), il est recommandé de placer les adultes et les juvéniles dans des bassins différents (ou dans des zones différentes à l'intérieur d'un même bassin si ces zones peuvent être séparées physiquement), afin de réduire au minimum le stress dû à la capture des adultes (figure 5b). La répartition des bassins entre chaque traitement (témoin, effluent) doit se faire de façon aléatoire – même si la figure 5 montre le contraire pour faciliter l'illustration – et les poissons sont également répartis de façon aléatoire entre chaque bassin. On réduit ainsi au minimum les différences entre les bassins qui seraient dues à des facteurs tels que l'emplacement du bassin sur la remorque.

Après l'ensemencement, on laisse les poissons s'adapter aux conditions en cours d'eau artificiel pendant au moins 72 heures, avant d'y ajouter l'effluent. Les bassins doivent être recouverts d'un filet pour réduire au minimum la perte de poissons qui s'échapperaient des seaux ou qui seraient la proie des oiseaux. Durant la période d'exposition (de 30 à 60 jours), les poissons sont nourris de granulés pour truites à raison de 4 à 6 % du taux corporel total par bassin, par jour, la grosseur des granulés variant en fonction de la taille de l'espèce à l'étude. Lors d'études antérieures, les granulés ont été pulvérisés avant d'être servis aux poissons.

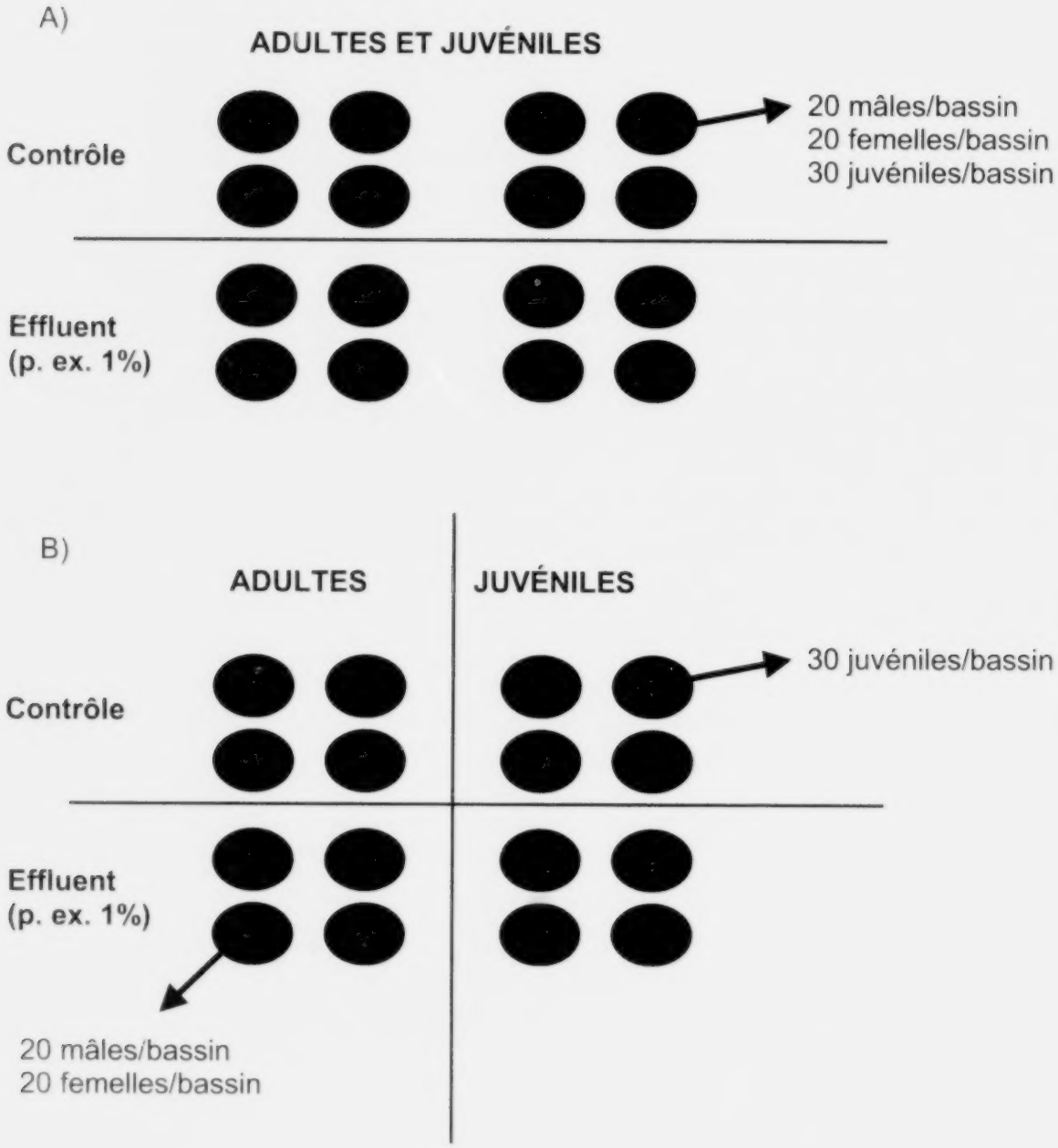


Figure 11-5 Scénarios de répartition des poissons où A) les adultes et les juvéniles sont placés dans le même bassin et B) les adultes et les juvéniles sont placés dans des bassins distincts. En situation réelle, la répartition des bassins entre les divers traitements se fait de façon aléatoire.

11.1.10.4.2 Entretien et surveillance

L'entretien quotidien pendant la durée de l'étude inclut l'étalonnage du débit de l'eau et des effluents dans chaque bassin, pour s'assurer que l'on obtient les dilutions voulues, ainsi que le nettoyage des grilles et l'alimentation des poissons. Les conduites d'évacuation d'eau de chaque bassin sont grillagées pour éviter la perte de poissons (figure 3c) et ces grilles doivent être nettoyées chaque jour pour ne pas que le tuyau de trop-plein s'encrasse. Il faut aussi voir chaque jour à l'entretien de la pompe et remplacer les conduites péristaltiques s'il y a encrassement, croissance d'algues ou fuite causée par l'usure due au frottement contre les têtes de la pompe.

Il faut vérifier chaque jour s'il y a des poissons morts dans chaque bassin et mesurer divers paramètres physiques et chimiques de l'eau (incluant la température, la concentration en oxygène dissous, la conductivité et le pH). Ces mesures peuvent être prises à l'aide d'instruments YSI ou d'appareils de lecture continue comme un hydrolab ou une thermistance. L'oxygène dissous est un critère d'une importance vitale, en particulier dans les études sur des effluents à forte teneur en matières organiques (p. ex., les effluents des usines de pâtes). Dans tous les bassins, le taux d'oxygène dissous doit être maintenu à au moins 60 % et, de préférence, au-dessus de 80 %, en utilisant, au besoin, un système d'aération.

11.1.10.4.3 Échantillonnage et analyse des poissons

L'ordre d'échantillonnage des bassins doit être aléatoire et, idéalement, tous les bassins devraient être échantillonnés le même jour. Si cela est impossible, l'échantillonnage aléatoire réduira les différences entre les bassins répétés qui ne sont pas analysés le même jour. Il faut terminer l'échantillonnage de tous les poissons d'un même bassin, avant de passer au suivant.

Au moment de l'échantillonnage d'un bassin, l'alimentation en eau et en effluent dans ce bassin est interrompue et la hauteur d'eau est réduite à l'aide de siphons grillagés. On peut aussi retirer les grosses roches pour faciliter l'échantillonnage, et les poissons sont recueillis à l'aide de filets à main. La répartition des mâles, des femelles et des juvéniles entre trois seaux différents, au cours du prélèvement, facilite les opérations. Les poissons sont gardés dans des seaux couverts et aérés, jusqu'au moment d'effectuer les mesures. Une équipe efficace de quatre personnes devrait pouvoir mesurer tous les poissons d'un même bassin, en moyenne en une demi-heure.

Les mesures prises et leur niveau de précision doivent être conformes aux normes prescrites dans les guides techniques d'Environnement Canada (1998, 2001). Les procédures relatives à la préparation des échantillons, aux analyses en laboratoire et à l'AQ/CQ sont les mêmes, pour les études en mésocosmes et sur le terrain.

11.1.10.5 Évaluation et interprétation des données

11.1.10.5.1 Exigences générales

Lors des études en mésocosmes, il doit y avoir évaluation et interprétation des données après chaque phase de suivi ou d'évaluation, comme cela se fait pour les études sur le terrain. Cette phase d'évaluation et d'interprétation des données vise à répondre aux questions suivantes :

- y a-t-il un effet?
- l'effet est-il relié à l'usine?
- connaît-on l'ampleur et l'étendue de l'effet? et,
- connaît-on la cause de l'effet relié à l'usine?

Aux fins du programme d'ESEE, un effet sur le poisson fait référence à une différence statistique entre les mesures portant sur des populations de poissons provenant de la zone d'exposition et de la zone de référence). Nous ne présentons ici qu'un aperçu de la méthode proposée pour l'analyse et l'interprétation des données pour les études en mésocosmes; pour plus d'informations à ce sujet, consulter Environnement Canada (1998, 2001).

À l'issue de la phase d'évaluation et d'interprétation des données, les fabriques doivent soumettre un rapport d'interprétation à l'agent d'autorisation (AO). Ce rapport doit entre autres faire mention de toute modification apportée au plan d'étude soumis, de tout effet observé et des conclusions de l'étude, et inclure un calendrier indiquant à quel moment sera réalisée la prochaine phase de suivi.

11.1.10.5.2 Analyse statistique des paramètres

Pour déterminer s'il y a ou non effet sur le poisson exposé aux effluents dans le système de mésocosmes, on procède à une analyse statistique des données tel qu'indiqué aux tableaux 3 et 4. Les variables biologiques seront utilisées pour calculer les paramètres suivants :

Consommation d'énergie (croissance et reproduction)

- croissance : taille des juvéniles à la fin de la période d'exposition, comparativement aux mesures prises au début de l'étude;
- reproduction : poids des gonades (par rapport au poids corporel et à la longueur); fécondité (par rapport au poids corporel et à la longueur).

Survie

- pourcentage de survivants dans les bassins, à la fin de la période d'exposition.

Stockage d'énergie (condition)

- condition (poids corporel par rapport à la longueur);
- poids du foie (par rapport au poids corporel et à la longueur).

Il est fréquent que l'on observe des différences entre les sexes, au niveau du taux de croissance, du poids corporel, du coefficient de condition, de la taille des gonades et de la taille du foie, car les besoins énergétiques globaux des mâles et des femelles diffèrent. Il faut donc évaluer les deux sexes séparément pour estimer la variabilité de chaque paramètre. De même, les poissons immatures ou juvéniles devraient eux aussi être analysés séparément. On utilisera de préférence les analyses indiquées aux tableaux 3 et 4, bien que d'autres analyses portant sur des paramètres précis peuvent aussi être réalisées, selon la variabilité de l'ensemble de données. À titre d'exemple, les sujets utilisés pour l'ensemencement des bassins, dans les études en mésocosmes, sont de taille similaire. Donc, la variabilité des paramètres mesurés est moindre que lors des études sur le terrain et les analyses de régression des données, comme l'analyse de covariance, portent sur un intervalle de valeurs plus petit. Dans ce cas, on procédera à une analyse de la variance du poids initial des organes (taille du foie et des gonades) et, de préférence, à une analyse des mesures de rapport (indice hépatosomatique ou indice gonadosomatique) ou des coefficients de condition.

L'ordre d'analyse des données est essentiellement une question de préférence personnelle, mais les méthodes recommandées se divisent en cinq étapes : a) préparation des analyses; b) compilation de statistiques sommaires initiales; c) analyses de variance; d) analyses de covariance et e) analyses de la puissance statistique. Pour plus d'information sur ces différentes étapes, consulter Environnement Canada (1998, 2001). Les facteurs statistiques propres aux études en mésocosmes sont définis ci-après.

Tableau 11-3: Effets sur le poisson - Paramètres biologiques recommandés pour déterminer les effets (un effet étant ici défini comme une différence statistiquement significative entre les bassins d'exposition et les bassins de référence)

Type de réponse	Paramètre	Méthode statistique
Survie	Survie des juvéniles et des adultes	Analyse de variance
Consommation d'énergie (Croissance)	Croissance des juvéniles (variation de la longueur dans le temps)	Analyse de variance (à plusieurs niveaux)
	Croissance des juvéniles (variation du poids net total de l'animal dans le temps)	Analyse de variance (à plusieurs niveaux)
(Reproduction)	Taille relative des gonades (poids des gonades par rapport au poids corporel) – Adultes	Analyse de covariance
Stockage d'énergie (condition)	État des juvéniles et des adultes (poids corporel par rapport à la longueur)	Analyse de covariance
	Taille relative du foie (poids du foie par rapport au poids corporel) - Adultes	Analyse de covariance

Tableau 11-4: Paramètres biologiques à utiliser pour les analyses complémentaires. Ces analyses sont menées à des fins d'information et l'effet n'est pas nécessairement déterminé en fonction des différences statistiquement significatives entre les bassins d'exposition et de référence

Type de Réponse	Variable complémentaire	Méthode statistique
Consommation d'énergie (Croissance)	Poids corporel des adultes (total)	Analyse de variance (à plusieurs niveaux)
	Taille des adultes	Analyse de variance (à plusieurs niveaux)
(Reproduction)	Taille relative des gonades (poids des gonades par rapport à la longueur) – Adultes	Analyse de covariance
	Fécondité relative (N^{bre} d'oeufs/femelle en fonction du poids corporel)	Analyse de covariance
	Fécondité relative (N^{bre} d'oeufs/femelle en fonction de la longueur)	Analyse de covariance
Stockage d'énergie (condition)	Taille relative du foie (poids du foie par rapport à la longueur)	Analyse de covariance
	Taille relative des œufs (poids moyen des œufs par rapport au poids corporel)	Analyse de covariance

11.1.10.5.3 Analyse de la variance à plusieurs niveaux

Pour toute variable mesurée une seule fois sur l'ensemble d'un système de bassins répétés, le plan statistique consiste en un simple test *t* qui compare les traitements (exposition/témoin). Les mésocosmes ou bassins sont les unités de répétition des traitements. Cependant, tous les paramètres biologiques et biochimiques sont mesurés sur les échantillons répétés à un niveau inférieur – c'est-à-dire sur des poissons individuels ou des groupes composés de plusieurs poissons à l'intérieur des bassins. Ces variables sont analysées par analyse de la variance à plusieurs niveaux (tableau 5). Si la variance entre les bassins répétés d'un même traitement (erreur de type I) est élevée par rapport à la variance entre des échantillons uniques ou composites à l'intérieur d'un même bassin (erreur de type II), l'analyse de la variance à plusieurs niveaux consiste en fait en un test *t* qui compare les traitements – les moyennes des bassins servant d'observations répétées. Cependant, si l'erreur I est faible par rapport à l'erreur II (p. ex., $p>0,25$), alors les deux termes d'erreur peuvent être regroupés pour accroître la puissance du test de comparaison des traitements (en d'autres mots, le sujet individuel ou l'échantillon composite devient maintenant l'unité de répétition, au lieu du bassin).

Tableau 11-5: Tableau de l'analyse de la variance à plusieurs niveaux, avec deux traitements, quatre bassins répétés par traitement et *n* échantillons individuels ou composites dans chaque bassin répété

Source		nγ	Test F
Traitement	Tr	(Tr-1) = 1	MS (Tr) /MS (Erreur 1)
Bassins par traitement	Erreur 1	Tr(r-1) = 6	MS (Erreur 1) /MS (Erreur 2)
Échantillons individuels ou composites dans chaque bassin	Erreur 2	T(n-1) = 232	

Où : nu = degrés de liberté; MS = carré moyen
Tr = nombre de traitements, r = nombre de bassins répétés par traitement
T = nombre de bassins; n = nombre de poissons par bassin

11.1.10.5.4 Analyse de covariance

L'estimation de la plupart des paramètres se fait par régression d'une variable par rapport à une autre, par analyse de covariance. L'analyse de covariance réunit les caractéristiques des analyses de variance et de régression et peut être utilisée pour comparer des régressions entre de multiples classifications (c.-à-d. aires d'échantillonnage) (Snedecor et Cochran, 1980). L'erreur quadratique moyenne (EQM; variance du modèle, s^2 = E.-T.^{2} des résidus de la régression]) du modèle de l'analyse de covariance devrait être utilisée pour estimer la variance des paramètres du poisson, lorsque l'échantillon est suffisamment large (au moins 20 poissons). Pour les études en mésocosmes, toutefois, les poissons sont choisis de manière à tous se situer à l'intérieur d'une fourchette de taille et d'âge comparativement restreinte. Il n'est donc peut-être pas nécessaire de procéder à une analyse de covariance pour tenir compte de l'effet de la covariable taille/âge sur les paramètres mesurés. Cependant, s'il faut étendre la fourchette des tailles et des âges à cause d'une disponibilité restreinte de poissons, des analyses de covariance peuvent s'avérer nécessaires pour éliminer les effets de la taille et de l'âge sur certains paramètres.

11.1.10.6 AQ/CQ et analyse des données

On n'insistera jamais assez sur l'importance d'assurer la qualité des données. Il y a certains éléments fondamentaux à respecter, relativement au plan de l'étude, à la cohérence des méthodes et des mesures, ainsi qu'à la définition des protocoles et des démarches, et ces exigences sont définies en détail dans Environnement Canada (1998, 2001).

Les données doivent être évaluées pour juger de la validité des hypothèses statistiques, notamment quant à la normalité et à l'homogénéité de la variance, avant d'appliquer les méthodes paramétriques définies dans Environnement Canada (1998, 2001). Cependant, la plupart des méthodes statistiques univariées, basées sur une distribution normale, sont assez robustes et peuvent justifier des écarts modérés par rapport aux hypothèses formulées. La transformation des

données initiales facilitera la normalisation des données ou l'homogénéisation des variances. On préfère souvent la transformation logarithmique, car on considère que la plupart des paramètres biologiques varient selon une échelle logarithmique ou exponentielle (Peters, 1983). Si la transformation ne permet pas d'obtenir des données qui répondent aux hypothèses, on utilisera des statistiques non paramétriques.

Au moment de concevoir une expérience, il est également souhaitable d'assurer la répartition aléatoire des réplicats entre les différents niveaux de traitement, afin que les réponses observées dans chaque échantillon répété soient indépendantes des autres échantillons répétés. Ce caractère aléatoire permet, dans une certaine mesure, de s'assurer que les différences observées entre les réponses obtenues aux différents traitements sont imputables aux effets du traitement proprement dit et non à quelque autre facteur. La répartition aléatoire des échantillons répétés entre les différents niveaux de traitement est relativement facile à réaliser durant des expériences de manipulation (comme les études en mésocosmes), mais est plus difficile lors des études d'observation sur le terrain. Le haut degré d'hétérogénéité spatiale et la difficulté d'obtenir de véritables échantillons répétés, en milieu naturel, font qu'il est difficile de procéder à des études de suivi biologique visant à prévoir les effets quantitatifs d'effluents complexes sur le biote (Buikema et Voshell, 1993; Forbes et Forbes, 1994). Bien que le suivi biologique fournisse des observations et des précisions importantes sur les effets de l'effluent sur le biote, il est souvent impossible de vérifier des hypothèses déductives lors d'études sur le terrain (Stewart-Oaten *et al.* 1992; Cooper et Barmuta, 1993). Les expériences en cours d'eau artificiels sont alors préférables, car elles permettent de contrôler des variables environnementales pertinentes et aussi de faire une véritable répétition des traitements (McIntire, 1993; Culp et Podemski, 1996). On peut donc déterminer de façon catégorique les rapports de causalité (c.-à-d. cause et effet).

11.1.11 Évaluation des effets sur la communauté d'invertébrés benthiques

11.1.11.1 Plan d'étude

11.1.11.1.1 Sélection de l'espèce

La communauté benthique constituée pour l'étude en mésocosmes doit être représentative de celle que l'on retrouve dans les zones de référence sur le terrain. Des échantillons benthiques sont prélevés de la rivière, puis on procède à l'ensemencement de l'ensemble de la communauté dans chacun des bassins du système de mésocosmes. Après avoir comparé la structure de la communauté des invertébrés benthiques dans les mésocosmes et les zones de référence, Culp *et al.* (1996, 2001), Podemski (1999) et Culp *et al.* (2000a) n'ont observé aucune différence écologiquement significative entre les deux structures, ce qui témoigne de l'efficacité de la technique d'ensemencement et de l'utilité du système de mésocosmes pour évaluer les effets d'un effluent sur des communautés d'invertébrés benthiques écologiquement pertinentes.

D'autres études en mésocosmes, portant cette fois-ci sur la rivière Athabasca, témoignent également de l'efficacité des cours d'eau artificiels pour évaluer les effets des effluents sur des communautés fluviales écologiquement pertinentes (Culp et Podemski, 1996; Culp *et al.*, 2001). Ces études ont révélé que l'exposition aux effluents avait sensiblement augmenté la biomasse algale et l'abondance d'insectes benthiques dans les mésocosmes. Ces résultats sont compatibles

avec ceux observés sur le terrain, où l'on a également constaté une hausse de la biomasse des périphytons et de l'abondance des insectes benthiques dans les zones en aval de l'effluent (zones d'exposition), par comparaison aux zones de référence situées en amont. Ces études en cours d'eau artificiels viennent appuyer les hypothèses qui découlent d'études antérieures sur le terrain, à savoir que l'abondance accrue observée en aval des points de rejet est attribuable à l'enrichissement en matières nutritives provoqué par l'effluent des usines de pâtes (Anderson, 1989; Anderson, 1991). Les systèmes de mésocosmes ont également permis de mieux comprendre les mécanismes en vertu desquels les effluents des usines de pâtes influent sur l'écosystème d 'une rivière, car il a été possible d'établir une distinction entre les variables environnementales confusionnelles présentes au niveau d'une communauté (Culp et Podemski, 1996).

11.1.11.2 Mesures terminales

11.1.11.2.1 Mesures terminales biologiques

L'étude des invertébrés benthiques prévue dans le programme d'ESEE vise à déterminer si l'effluent de l'usine modifie la communauté d'invertébrés benthiques (c.-à-d. y a-t-il un effet?). Le système de mésocosmes peut être utilisé pour évaluer les effets de l'effluent sur une variété de paramètres benthiques, notamment sur la structure de la communauté et les processus qui s'y déroulent, ainsi que sur la croissance et la fécondité de certains membres choisis de cette communauté (Culp *et al.*, 1996; Culp et Podemski, 1996; Podemski et Culp, 1996; Culp *et al.*, 2000, Culp *et al.*, 2001). Les études sur une communauté sont plus réalistes sur le plan environnemental (c.-à-d. qu'elles sont plus exactes, car elles intègrent les effets modificateurs dus aux interactions entre les espèces dans l'ensemble des effets dus aux facteurs de stress); de plus, elles sont mieux en mesure de définir les composantes qui, à l'intérieur de la communauté, sont les plus sensibles à un effluent donné et elles intègrent une variété de processus écologiques (p. ex., concurrence et dynamique du réseau trophique) impossibles à simuler dans une étude sur une seule espèce (Forbes et Forbes, 1994). Les essais sur des espèces multiples sont en outre un moyen très efficace d'obtenir de l'information sur la sensibilité relative d'un grand nombre d'espèces au cours d'une même étude. Les études en mésocosmes permettent d'examiner les questions qui se posent à l'échelle de la communauté et qui ont trait aux effets potentiels de diverses concentrations d'effluent sur les producteurs primaires (algues fixées) et secondaires (insectes benthiques). Les paramètres précis mesurés dans le cadre de ces études incluent la croissance du périphyton, la croissance de certains taxons d'insectes, la structure des communautés d'algues et d'invertébrés, ainsi que la concentration de contaminants dans les algues (tableau 1) (Culp et Cash, 1995; Culp *et al.*, 2000; Culp *et al.*, 2001; Dubé *et al.*, 2001a).

Tous les paramètres servant à mesurer les effets d' un effluent sur les invertébrés benthiques dans le cadre des ESEE sur le terrain peuvent aussi être mesurés dans un système de mésocosmes. Aux fins du programme d'ESEE, un effet sur la communauté d'invertébrés benthiques se définit comme une différence statistique entre les mesures prises dans la zone d'exposition et la zone de référence, ou encore une différence statistique entre les mesures prises dans les aires d'échantillonnage de la zone d'exposition – lesquelles mesures indiquent une diminution graduelle de la concentration de l'effluent – à l'égard de n'importe lequel des descripteurs suivants :

- Densité totale des invertébrés
- Richesse du taxon (c.-à-d. familles)
- Indice de diversité de Simpson
- Indice Bray-Curtis (réduit, à un seul nombre, la différence globale au niveau de la communauté, entre le traitement témoin et le traitement d'exposition, et ne requiert pas la formulation d'hypothèses préalables au sujet de la nature de la communauté (Taylor et Bailey, 1997).

Pour l'interprétation des effets, il est recommandé de se baser sur l'homogénéité, ainsi que sur la densité, la proportion et la présence/l'absence du taxon (Environnement Canada, 2001). Ces descripteurs sont des mesures sommaires choisies pour englober l'éventail de réponses susceptibles d'être causées par l'effluent, y compris des changements dans la productivité, la composition des espèces et la biodiversité. La documentation fait état d'un grand nombre d'autres mesures descriptives sur les invertébrés benthiques (pour une revue, voir Resh et McElravy, 1993) qui peuvent être utilisées, s'il y a lieu, dans des conditions spécifiques au site pour faciliter l'interprétation des effets déterminés à partir des principaux descripteurs précités.

11.1.11.3 Période et durée de l'exposition aux effluents

Les études en mésocosmes sur les invertébrés benthiques peuvent être réalisées à n'importe quel moment, entre le début du printemps et la fin de l'automne. La température est le principal facteur limitant, l'utilisation des mésocosmes étant impossible à une température inférieure à -5 °C à cause du gel des conduites d'eau. Les études devraient toutefois être réalisées à des périodes où l'exposition aux effluents est maximale, afin de reproduire les conditions environnementales les plus réalistes qui soient. De plus, les études devraient être menées à une période de l'année où la diversité des invertébrés benthiques est maximale et où la température de l'eau est propice à leur croissance. Si des données historiques sont disponibles, il serait utile de les examiner et, s'il y a lieu, de réaliser l'étude à une période similaire, afin de pouvoir établir des comparaisons. De même, les études de suivi subséquentes devraient être réalisées à des périodes similaires de l'année, là encore pour assurer la comparabilité des données.

La durée des études en mésocosmes sur les invertébrés benthiques est en général de 30 à 45 jours, ce qui comprend une période d'ensemencement de 7 à 12 jours pour les producteurs primaires et une période d'exposition de 25 à 30 jours aux effluents. Tous les paramètres liés à la communauté peuvent être mesurés – et l'ont en fait été – durant cette période. Les effluents sont prélevés chaque jour ou tous les deux jours durant les études et doivent être représentatifs des conditions normales d'exploitation de l'usine.

11.1.11.4 Protocole relatif aux invertébrés benthiques

11.1.11.4.1 Installation générale

Les exigences générales spécifiées aux sections 11.1.3 et 11.1.6 s'appliquent également aux études sur les invertébrés benthiques. Le débit total recommandé pour l'eau de référence ou l'eau de dilution et l'effluent dans chaque bassin est de 2 L/min. Avec un tel débit, le temps de renouvellement est de deux heures dans chaque bassin (volume : 227 L). Un temps de renouvellement de quatre heures a aussi été utilisé pour réduire la quantité d'effluents requis, mais il s'agit du maximum. En effet, il n'est pas recommandé d'avoir un temps de renouvellement plus long, à cause des effets qui en résultent sur la température et le taux d'oxygène dissous dans les bassins. Pour les applications sur les invertébrés, la vitesse du courant dans chaque bassin est maintenue à l'aide d'un système à hélices entraîné par courroie (voir la section 11.1.3). Le courant dans chaque bassin est fixé en fonction des conditions propres au site, mais il varie habituellement entre 10 et 20 cm/s.

Avant d'introduire le substrat, cinq sacs d'échantillonnage (0,1 m^2, maille de 500 µm) sont déposés dans le fond de chaque bassin. Ces sacs sont retirés à la fin de l'expérience, ce qui donne cinq sous-échantillons par bassin. Un milieu benthique normalisé est reproduit à l'intérieur de chaque bassin pour simuler l'habitat dominant dans l'environnement. Jusqu'à maintenant, les études en mésocosmes sur les invertébrés benthiques ont porté principalement sur des habitats fluviaux dominés par des rapides. Le fond de chaque bassin et les sacs d'échantillonnage sont recouverts d'une couche de 8 cm de gravier lavé (pierres d'un diamètre de 1 à 2 cm). Le gravier est laissé pendant une période de colonisation de 7 à 12 jours, pour favoriser une croissance algale et microbienne suffisante. Seul un apport en eau est assuré dans les mésocosmes (2 L/min) durant cette période de colonisation. La durée de la période de colonisation varie en fonction des conditions propres au milieu et elle dépend de la température et de la colonisation des algues de la rivière dans le système.

À l'issue de la période de colonisation, on procède au transfert des communautés benthiques dans les mésocosmes, ce protocole étant lui aussi spécifique au site. Nous vous présentons ci-après un exemple d'un protocole d'ensemencement pour un habitat caractérisé par des rapides sur substrat composé essentiellement de grosses pierres et de gravier :

1. De larges pierres (~x superficie = 535 cm^2) sont sélectionnées de façon aléatoire dans la zone de référence de la rivière et sont déposées dans les mésocosmes avec le périphyton et les invertébrés qui y correspondent. Ces roches ajoutent au substrat et favorisent l'ensemencent des bassins par une communauté naturelle de périphyton et d'invertébrés benthiques.
2. Les pierres sont recueillies à l'aide d'un filet en U de 0,1 m^2 (maille de 500 µm) (Scrimgeour *et al.*, 1993); elles sont soulevées avec soin du lit de la rivière et sont déposées dans un seau contenant de l'eau de la rivière. Le substrat de gravier sous les roches est ensuite remué doucement (jusqu'à une profondeur de 5 cm) pour recueillir tout invertébré qui serait présent sous et autour de la base des roches. Le seau est transporté avec soin jusqu'au système de mésocosmes, en évitant de déloger le périphyton et les invertébrés présents sur les roches. Les pierres sont réparties au hasard entre les bassins et sont placées de manière à ce que leur orientation par rapport à l'écoulement de l'eau rappelle leur

orientation dans le milieu naturel. Ce processus se poursuit jusqu'à ce que l'on obtienne la densité voulue de pierres (p. ex., 10 larges pierres par bassin artificiel), d'après la composition du substrat en milieu naturel. D'autres appareils d'échantillonnage peuvent aussi être utilisés pour ensemencer les bassins par les communautés benthiques et tels que décrits dans Environnement Canada (1998, 2001); l'objectif visé est de reproduire, dans les mésocosmes, la densité du milieu ambiant. Pour déterminer le nombre d'échantillons de la rivière devant être placés dans chaque bassin, on divise la superficie du système de mésocosmes (0,9 m^2) par la superficie de l'échantillonneur choisi. Cette répartition aléatoire des sous-échantillons prélevés à partir d'échantillons communs permet de s'assurer que la composition des invertébrés est similaire dans chaque bassin et elle limite la variabilité dans la composition de la communauté dans les différents mésocosmes, qui serait imputable au profil d'introduction des espèces (Wrona *et al.*, 1982).

3. Une autre série d'échantillons benthiques (biote seulement) est prélevée de la zone de référence et placée dans un contenant commun, pour estimer la composition et la densité initiales. Des sous-échantillons (Marchant, 1989) sont ensuite prélevés et ensemencés au hasard dans chaque bassin artificiel, jusqu'à ce que la densité des invertébrés dans les bassins se rapproche de la densité en milieu ambiant.

Il est important d'appliquer des protocoles d'ensemencement uniformisés, car la séquence utilisée pour répartir les échantillons prélevés d'une source commune entre les différents mésocosmes peut donner lieu à de grandes différences dans la structure de la communauté, différences qui ne sont aucunement liées aux traitements à l'étude (Drake *et al.*, 1996). La communauté d'essai est constituée de multiples niveaux trophiques établis à partir d'échantillons aléatoires prélevés de la rivière à l'étude. Il est donc possible de mesurer des paramètres portant sur l'ensemble de la communauté, par exemple la composition des espèces, le rapport production-respiration au niveau de la communauté et la décomposition. Ces mesures reflètent les effets directs des facteurs d'agression et, plus important encore, les effets écologiques indirects qui ne peuvent être simulés lors d'une étude sur une espèce unique ou sur une chaîne trophique unique (p. ex., changements dans la structure de la communauté dus à la concurrence, ou bioamplification) (Carlisle, 2000).

Après l'ensemencement du biote, une période d'adaptation de 24 à 48 heures est prévue (apport d'eau seulement dans les mésocosmes) avant de commencer l'introduction de l'effluent dans les bassins de traitement.

11.1.11.4.2 Entretien et surveillance

L'entretien et la surveillance se font conformément au protocole défini pour le poisson à la section 11.1.10.4.2. Les bassins sont inspectés chaque jour et les grilles des drains de vidange sont nettoyées afin de prévenir l'obstruction et le débordement des bassins. Les moteurs sont lubrifiés à l'aide du lubrifiant non toxique Permatex Superlube ® (qualité alimentaire USDA H1) tous les trois à six jours, pour éviter le blocage de l'arbre de transmission. Les conduites d'alimentation en eau sont purgées régulièrement pour en éliminer les dépôts de limon et de sable. Le débit d'eau et de la solution de traitement dans chaque bassin est étalonné régulièrement. Le tuyau d'arrivée de l'effluent doit aussi être inspecté chaque jour, afin de déceler tout signe d'obstruction et d'usure sous l'effet du frottement des têtes de la pompe, et il doit être remplacé, au besoin.

Les exigences quotidiennes, relativement à la surveillance de chaque bassin, incluent la mesure des paramètres physiques et chimiques de l'eau, y compris la température, le taux d'oxygène dissous, la conductivité et le pH. Ces mesures peuvent être prises à l'aide d'instruments YSI ou d'appareils d'enregistrement continu tels qu'un hydrolab ou une thermistance. Le taux d'oxygène dissous est un paramètre d'une importance vitale, notamment pour les études sur des effluents à forte teneur en matières organiques (p. ex., les effluents des usines de pâtes). Dans tous les bassins, le taux d'oxygène dissous doit être maintenu à au moins 60 % -- et de préférence à 80 % -- en utilisant, au besoin, un système d'aération.

11.1.11.5 Échantillonnage et analyse des algues et des invertébrés benthiques

L'échantillonnage des communautés d'algues dans les mésocosmes est considéré comme une mesure complémentaire pour évaluer les effets des effluents sur les communautés d'invertébrés benthiques. Nous présentons néanmoins l'information sur l'échantillonnage et la collecte, car ces échantillons doivent être prélevés avant l'échantillonnage des invertébrés benthiques pour assurer l'intégrité de l'échantillon. L'échantillonnage des bassins se fait par sélection aléatoire afin de réduire au minimum les différences imputables à la période d'échantillonnage des bassins répétés pour l'étude d'un même traitement. Les échantillons de périphyton sont prélevés une fois, à la fin de la période d'exposition, et un échantillon composite formé de trois pierres par bassin est analysé pour réduire la variabilité. L'échantillonnage des pierres se fait à l'aide d'un scalpel qui sert à prélever le périphyton sur une plaque d'une superficie déterminée (p. ex., 9,6 cm^2). Les échantillons de périphyton sont placés dans des flacons et conservés sur la glace jusqu'au moment d'être congelés (la même journée). Au laboratoire, chaque échantillon est homogénéisé et divisé en deux parties, et chaque portion est filtrée à travers un filtre GF/C. La concentration de *chlorophylle a* est déterminée par extraction du filtre et des substances qui y sont fixées dans un bain d'éthanol à 90 % à 80 °C, pendant 5 min, puis en mesurant la fluorescence à l'aide d'un fluorimètre Turner Designs de la série 10. La masse sèche sans cendre est déterminée en pesant l'échantillon après séchage pendant 24 h à 105 °C, puis en brûlant le filtre à 500 °C et en déterminant la perte de poids après la calcination.

L'échantillonnage des invertébrés benthiques dans les bassins se fait également de façon aléatoire pour réduire au minimum les différences dues à la période d'échantillonnage des différents bassins répétés d'un même traitement. Le prélèvement des échantillons d'invertébrés se fait en soulevant les sacs d'échantillonnage déposés au fond de chaque bassin; on obtient donc cinq sous-échantillons par bassin. Les sous-échantillons sont ensuite lavés dans un tamis à maille de 500 µm. Le tamisage sur le terrain doit se faire immédiatement après l'extraction de l'échantillon et avant sa conservation, tel que prescrit par Environnement Canada (1998, 2001). La taille recommandée du tamis ou des mailles pour toutes les applications du système de mésocosmes en eau douce est de 500 µm. En eau douce, les macroinvertébrés se définissent comme ceux retenus par des mailles de 200 à 500 µm (Slack *et al.*, 1973; Weber, 1973; Wiederholm, 1980; Suess, 1982), bien que les organismes immatures de certains taxons puissent être plus petits et que certains puissent être plus gros au stade adulte. À noter que ce maillage s'applique à l'ensemble du matériel utilisé sur le terrain et en laboratoire (c.-à-d. filet de Nitex sur les échantillonneurs d'invertébrés benthiques et le tamis). Dans certaines circonstances spécifiques du milieu, il peut être souhaitable d'utiliser un tamis de plus petit calibre pour recueillir des organismes plus petits. Voici quelques cas où l'utilisation d'un maillage plus petit (moins de 500 µm) pourrait être indiquée :

1) pour établir des comparaisons, si des tamis de maillage plus petits ont été utilisés dans le cadre d'études antérieures sur les invertébrés benthiques du système à l'étude, ou
2) si, pour des raisons d'ordre pratique, l'échantillonnage doit être fait à une période de l'année où les organismes sont très petits. Rees (1984), Barber et Kevern (1974) et Jonasson (1955) fournissent plus de précisions sur les variations saisonnières du maillage.

Dans les cas précités, il est fortement recommandé d'utiliser une série de tamis superposés dont le maillage satisfait tout au moins au calibre obligatoire et d'utiliser tout autre maillage plus petit, s'il y a lieu. De cette façon, on satisfait non seulement aux critères spécifiques du milieu, mais aussi aux objectifs du programme d'ESEE car l'utilisation de tamis de maillage normalisé permet de faire des comparaisons nationales ou régionales.

Après le tamisage de l'échantillon, les invertébrés sont conservés immédiatement dans du formol à 10 %. Au laboratoire, les échantillons sont triés et identifiés. Lors d'études précédentes en mésocosmes, on a utilisé trois sacs d'échantillonnage prélevés au hasard de chaque bassin pour en trier le contenu. La *famille* est le niveau d'identification hiérarchique recommandé. Toutes les statistiques sommaires et mesures descriptives doivent être calculées et déclarées au niveau de la famille, en vue de la production des rapports d'interprétation exigés aux fins du programme d'ESEE. Les organismes qui ne peuvent être identifiés au niveau taxonomique voulu sont classés dans une catégorie distincte, dans l'ensemble de données de base. Il est recommandé que les chercheurs utilisent les clés taxonomiques qui conviennent à la région géographique à l'étude; une liste détaillée des références taxonomiques pour divers groupes d'organismes dulcicoles est présentée dans Environnement Canada (1998, 2001).

11.1.11.6 Évaluation et interprétation des données

L'étude en mésocosmes, pour l'évaluation des effets d'un effluent sur la communauté d'invertébrés benthiques, se fait essentiellement selon le protocole défini dans Environnement Canada (1998, 2001) pour l'évaluation et l'interprétation des données lors des enquêtes sur le terrain, puisque les mesures terminales sont les mêmes. La seule différence au niveau de l'évaluation des données a trait au nombre de répétitions par traitement : pour les études en mésocosmes, $n = 8$ selon le protocole contrôle/impact, alors que $n = 5$ pour les études sur le terrain. L'évaluation et l'interprétation des données après chaque phase de surveillance visent à répondre aux questions suivantes :

- y a-t-il un effet?
- l'effet est-il relié à la fabrique?
- connaît-on l'ampleur et l'étendue de l'effet? et,
- connaît-on la cause de l'effet relié à la fabrique?

Durant l'évaluation des effets, toute différence significative entre la zone de référence et la zone d'exposition, en regard de l'un ou l'autre des descripteurs principaux suivants, doit être interprétée comme un effet sur la communauté d'invertébrés benthiques :

1) Densité totale d'invertébrés
2) Richesse du taxon (c.-à-d. famille)
3) Indice de diversité de Simpson
4) Indice Bray-Curtis

Il est recommandé de s'appuyer sur l'uniformité, ainsi que sur la densité, la proportion ou la présence/l'absence du taxon, pour faciliter l'interprétation des effets (Environnement Canada, 2001). Le calcul de ces mesures est décrit en détail dans Environnement Canada (1998, 2001). Les analyses statistiques, les méthodes d'AQ/CQ des données et les exigences en matière de production de rapports sont les mêmes que pour les études sur le terrain, l'hypothèse étant qu'un traitement en mésocosmes équivaut à une zone d'exposition, tandis que chaque bassin artificiel répété correspond à une station de mesure sur le terrain.

11.1.12 Mesures d'appui

11.1.12.1 Mesures terminales liées à la chimie de l'eau

Dans les études en mésocosmes, il est essentiel de réduire au minimum les différences entre les bassins au niveau des paramètres physiques et chimiques de l'eau, afin que les effets attribués à l'effluent ne soient pas dus à des facteurs confondants. Donc, la température, le taux d'oxygène dissous, le pH et le débit d'entrée de l'eau et de l'effluent sont vérifiés tous les jours. On doit aussi mesurer la vitesse du courant au début et à la fin de chaque étude, en particulier dans les études sur les invertébrés benthiques. La distribution de la vitesse du courant entre les bassins se fait en utilisant une des nombreuses marques de mesureurs de la vitesse. Lors d'études précédentes, la vitesse moyenne dans les mésocosmes (au-dessus du substrat rocailleux) ($x = 0,26 \pm 0,01$ m/s, $n = 150$) a été réglée de manière à être similaire à la vitesse du courant mesurée au-dessus des pierres, à une profondeur similaire sur le terrain (vitesse du courant $x = 0,26 \pm 0,01$ m/s; profondeur de l'eau $x = 24,8 \pm 0,72$ cm, $n = 30$) (Podemski, 1999).

La température de l'eau peut être mesurée avec un enregistreur continu. Pour ce faire, on place des enregistreurs dans un bassin et dans le réservoir de charge, la température dans le réservoir de tête correspondant à la température de l'eau puisée de la rivière. Selon les données recueillies à l'aide de thermographes placés à ces deux endroits lors d'études précédentes, un temps de séjour de deux heures dans les bassins provoque un léger refroidissement ou réchauffement de l'eau, selon les températures de l'air ambiant (Culp et Podemski, 1996). Par exemple, sur une période de trois jours, l'eau dans les bassins était plus froide la nuit et plus chaude le jour que l'eau de la rivière, l'écart maximal instantané entre la température de l'eau dans la rivière et le bassin étant $<5\ ^{0}C$.

Un protocole par mesures répétées (MR) convient à l'analyse des variables reflétant la qualité physique et chimique de l'eau mesurées plus d'une fois (tableau 6), puisque les mesures sont prises chaque fois sur les mêmes échantillons répétés (Paine, 1996). Le protocole par MR est utile pour déterminer dans quelle mesure le système de mésocosmes permet d'éliminer l'effet de toutes les variables, à l'exception de celles liées à l'exposition à l'effluent. En général, dans une étude d'impacts, les analyses des paramètres physiques et chimiques sont jugées complémentaires ou secondaires à l'analyse des paramètres biologiques et chimiques (c.-à-d. mesures des effets) et les résultats sont présentés en annexe.

Tableau 11-6: Tableau de l'analyse de la variance selon un protocole par mesures répétées (MR) avec deux traitements, quatre bassins répétés par traitement et *t* temps de mesure

Source		nγ	Test F
Traitement	Tr	(Tr-1)	MS (Tr) /MS (Erreur 1)
Bassins par traitement	Erreur 1	Tr(r-1)	MS (Erreur 1) /MS (Erreur 2)
N^{bre} fois	T	(t-1)	MS (T)/MS (Erreur 2)
Traitement x n^{bre} fois	Tr x T	(Tr-1)(t-1)	MS (Tr x T) /MS (Erreur 2)
Bassins par traitement x n^{bre} fois	Erreur 2	Tr(r-1)(t-1)	

Où : nγ = degrés de liberté; MS : carré moyen
Tr = nombre de traitements; r = nombre de répétitions par traitement
t = nombre de mesures répétées

11.1.13 Mesures terminales d'exposition

En plus d'évaluer les variations quotidiennes dans les paramètres physiques et chimiques de l'eau entre tous les bassins, on doit prélever d'autres échantillons d'eau – bien qu'à une fréquence moindre – pour l'analyse des paramètres de chimie générale. Il est recommandé de prélever des échantillons du réservoir de charge qui contient l'eau de référence, de l'effluent pleinement concentré et de chaque mésocosme, une fois à la fin de l'étude. Les échantillons devraient être analysés en regard des paramètres définis dans Environnement Canada paramètres complémentaires. Cette information s'avère souvent d'une valeur inestimable pour confirmer la dilution de l'effluent dans les bassins de traitement. Par exemple, dans des systèmes dulcicoles exposés à des effluents d'usines de pâtes, le sodium est un ion relativement conservateur présent en fortes concentrations. Donc, en comparant les concentrations de Na^+ dans les bassins de référence et les bassins d'exposition, on peut vérifier la concentration de l'effluent dans les bassins.

Le colorant rhodamine a aussi été utilisé à plusieurs occasions lors d'études en mésocosmes, après l'échantillonnage du biote, pour confirmer la concentration de l'effluent dans les bassins de traitement. Pour ce faire, une solution concentrée de rhodamine est préparée dans une cuve de stockage puis est introduite dans les bassins de traitement par les conduites d'effluent déjà en place. Après une période de renouvellement de 24 h, des échantillons sont prélevés dans le réservoir de charge contenant la rhodamine et dans chaque bassin de traitement, pour calculer les taux d'exposition.
Le principal avantage du système de mésocosmes est qu'il permet de contrôler les conditions d'exposition. Donc, il n'est habituellement pas nécessaire de procéder à des mesures chimiques pour confirmer l'exposition chez le biote. Ces mesures peuvent toutefois fournir des données complémentaires utiles dans le cas d'évaluations spécifiques du milieu. Dubé *et al.* (2001b), par exemple, ont mesuré certains acides résiniques (c.-à-d. l'acide déshydroabiétique) dans la bile du choquemort exposé à un effluent d'une usine dont la concentration rappelait celle observée dans l'environnement (3%) et ils ont comparé ces mesures à celles observées chez des poissons

témoins. Les résultats obtenus indiquent une concentration nettement supérieure d'acide déshydroabiétique, ce qui corrobore que cet acide est un indicateur approprié pour confirmer l'exposition à un effluent soumis à un traitement secondaire et provenant d'une usine de pâtes approvisionnée essentiellement en résineux. Ces résultats indiquent également des différences entre les poissons témoins et exposés, qui sont dues à l'effluent.

Les taux de métaux dans les tissus indicateurs ont également été utilisés comme variables d'appui dans le cadre d'études en mésocosmes visant à examiner les effets d'un effluent minier sur le poisson. Des tissus musculaires composites prélevés de saumons atlantiques juvéniles ont révélé des taux de métaux nettement supérieurs chez les poissons exposés à l'effluent minier pendant 39 jours, par comparaison aux poissons témoins (Dubé *et al.*, inédit), les métaux mesurés dans les tissus étant par ailleurs compatibles avec ceux décelés dans l'effluent. Les indicateurs et les tissus utilisés pour mesurer l'exposition aux métaux varient selon la mine et l'espèce utilisées. En général, toutefois, les branchies, le foie et les reins sont les organes qui conviennent le mieux à l'estimation de l'exposition et de la biodisponibilité des métaux. Dans le cas des espèces de petite taille (<10 cm), on peut se baser sur les concentrations dans l'organisme entier, ou dans la carcasse après extraction du tube digestif. Le mercure est le seul élément dont l'accumulation dans les tissus musculaires a été démontrée; donc si le mercure est un contaminant préoccupant, il faudrait analyser le tissu du muscle dorsal. Pour leur part, le sang et le tissu osseux peuvent révéler une exposition au plomb et leur analyse peut être envisagée, si le plomb est le principal métal préoccupant (Hodson *et al.*, 1984). Enfin, les concentrations osseuses devraient fournir les meilleures indications d'une exposition à long terme aux métaux, tandis que les concentrations sanguines reflètent une exposition à court terme (ETIMA, 1998).

11.1.14 Autres facteurs à considérer

Les principes directeurs du programme d'ESEE se définissent comme suit : le programme doit être scientifiquement défendable, rentable et suffisamment flexible pour s'adapter aux conditions propres au milieu. Pour faire en sorte que les programmes d'ESEE demeurent ciblés et rentables, des critères de sélection ont été définis aux fins du programme d'ESEE pour le secteur des pâtes et papiers, afin de s'assurer que seules des techniques de surveillance pertinentes sur le plan environnemental, interprétables et scientifiquement défendables soient recommandées (tableau 7). Le système de bassins artificiels satisfait à tous les critères énoncés, mis à part les exceptions indiquées ci-après. Ainsi, les études en bassins artificiels utilisées pour analyser les effets d'un effluent sur le poisson ne permettent pas d'examiner les interactions entre les espèces au niveau d'une communauté ou d'une population. Il convient toutefois de noter qu'il en va de même des études actuelles sur le terrain qui ne permettent pas non plus d'examiner les interactions entre de multiples espèces au niveau de la communauté ou de la population.

Parmi les autres facteurs susceptibles de limiter l'application des systèmes de bassins artificiels, mentionnons la difficulté d'accès et l'absence d'infrastructures dans certains sites de surveillance, ainsi que la durée du suivi (moyen terme, c.-à-d. semaines ou mois), ce qui rend impossible l'examen des procédés de bioaccumulation à long terme.

Tableau 11-7: Critères d'évaluation des solutions de rechange proposées pour le programme d'ESEE (d'après Dubé *et al.*, 2001a)

Critère d'évaluation	Description
1. Pertinence environnementale	• Les effets sur les organismes pertinents sont mesurés dans le milieu récepteur.
2. Interprétation des données	• Les mesures terminales permettent de déceler ou de quantifier les effets des effluents des usines de pâtes et papiers (ou effluents miniers) sur le poisson, l'habitat du poisson ou l'utilisation des ressources halieutiques. • Se prête à une évaluation et à une interprétation scientifiques uniformes. • Permet de déterminer l'existence d'un « effet » (différence statistiquement significative entre les sujets de référence et exposés).
3. Méthode scientifiquement défendable et applicable	• Existence de protocoles d'essai acceptables, y compris des méthodes d'AQ et de CQ. • Disponible dans le commerce. • Une étude de validation (p. ex., études pilotes) a été complétée.
4. Rentabilité	• La nouvelle technique fournit des données d'une qualité supérieure ou égale à celle des techniques actuellement acceptées. • Le coût de la technique se compare à celui des techniques actuellement acceptées.

La rentabilité du système de mésocosmes est essentielle à son utilisation aux fins du programme d'ESEE. Ce système peut s'avérer un outil efficace dans un cadre réglementaire, à la condition qu'il soit rentable et que le plan d'étude réponde aux objectifs du programme et aux hypothèses à vérifier. Les coûts d'un grand nombre de composantes de l'étude en mésocosmes se comparent à ceux d'une étude sur le terrain, car les mesures terminales sont les mêmes. Les coûts des analyses de laboratoire, par exemple, sont les mêmes. La principale différence entre les deux types d'études (sur le terrain ou en mésocosmes) vient des frais de main-d'œuvre et de l'utilisation du système de mésocosmes proprement dit. Les frais de main-d'œuvre et les coûts de transport du système dépendent du lieu de l'étude (ils sont donc spécifiques du milieu) et de la durée de la période d'exposition. Le transport du système sur place, le raccordement des réseaux d'alimentation en eau et en énergie, ainsi que l'ensemencement par le biote se font habituellement en quatre à cinq jours, par une équipe sur le terrain formée de quatre personnes et d'un électricien. Les coûts liés à l'utilisation et à l'entretien du système varient en fonction du fournisseur. Si le fournisseur envoie son personnel sur place pour toute la durée de la période d'exposition (60 jours), les coûts seront supérieurs à ceux d'une étude sur le terrain à cause des tarifs exigés par les fournisseurs. Notre approche a consisté jusqu'à maintenant à confier l'installation et le démontage du système au personnel du fournisseur, alors que l'entretien quotidien a été assumé par le personnel de la fabrique ou des étudiants embauchés l'été, car ces tâches requièrent au plus une demi-journée de travail et qu'elles n'exigent pas un haut niveau de connaissances scientifiques. À titre d'estimation, les coûts des études en mésocosmes devraient se situer dans la fourchette des prix des études sur le terrain, auxquels on ajoute environ 25 %.

Il ne faut pas oublier que les études en mésocosmes sont des alternatives aux études sur le terrain. S'il est impossible de réaliser une étude sur le terrain, il faut avoir recours à une autre méthode pour obtenir l'information voulue. Tout doit être fait pour utiliser des méthodes alternatives qui

soient rentables, car il s'agit du meilleur moyen d'obtenir des données de qualité possibles à interpréter, dans des milieux comportant des facteurs confondants. Si l'on envisage une étude en mésocosmes comme méthode alternative pour une fabrique particulière, un autre aspect qu'il faudrait envisager pour en assurer la rentabilité serait d'inclure plus d'une phase ou plus d'un effluent (p. ex., étudier la possibilité de réaliser des études conjointes entre diverses fabriques) dans le plan d'étude)..

11.1.15 Bibliographie

ETIMA (Programme d'évaluation des techniques de mesure d'impacts en milieu aquatique). 1998. *Sommaire et évaluation du rapport coût-efficacité des méthodes de surveillance des effets des effluents miniers sur les écosystèmes aquatiques évaluées sur le terrain en 1997 dans le cadre du programme ETIMA*. Centre canadien de la technologie des minéraux et de l'énergie, Ottawa (ON), Canada.

Anderson, A.M. 1989. *An assessment of the effects of the combined pulp mill and municipal effluents at Hinton on the water quality and zoobenthos of the Athabasca River*. Rapport. Environmental Quality Monitoring Branch, Environmental Assessment Division, Alberta Environment, Edmonton (AB), Canada.

Anderson, A.M. 1991. *An overview of long-term zoobenthic monitoring in Alberta rivers (1983-1987)*. Rapport. Environmental Assessment Division, Alberta Environment, Edmonton (AB), Canada.

Barber, W.E. et N.R. Kevern. 1974. Seasonal variation of sieving efficiency in a lotic habitat. *Freshwat. Biol.* 4: 293-300.

Buikema, A. et J.R. Voshell. 1993. « Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates ». In: D.M. Rosenburg et V.H. Resh (éd.), *Biomonitoring and benthic invertebrates*, Chapman and Hall, NY, États-Unis, p. 340-395.

Burt, A., Kramer, D.L., Nakasuru, K. et C. Spry. 1988. The tempo of reproduction in *Hyphessobrycon pulchripinnis* (Characidae), with a discussion on the biology of "multiple spawning". *Environ. Biol. Fish.* 22: 15-27.

Carlisle, D.M. 2000. Bioenergetic food webs as a means of linking toxicological effects across scales of ecological organization. *J. Aquat. Ecosystem Stress and Recovery* 7: 155-165.

Coad, B.W. 1995. *Encyclopedia of Canadian Fishes*. Musée canadien de la nature et Canadian Sportfishing Productions Inc., 928 p.

Cooper, S. D. et L. Barmuta. 1993. « Field experiments in biomonitoring ». In: Rosenberg, D.M. et V.H. Resh (éd.). *Biomonitoring benthic invertebrates*, Chapman and Hall, New York (NY), États-Unis, p. 399-441.

Culp, J.M. et K.J. Cash. 1995. *Potential impacts of effluent on the Thompson and upper Fraser Rivers*. DOE FRAP 1995-10. Plan d'action du Fraser, Direction de la conservation de l'environnement, Environnement Canada, Vancouver (CB), Canada.

Culp, J.M. et C.L. Podemski. 1996. « Design and application of a novel stream microcosm system for assessing effluent impacts to large rivers ». In: Servos, M.R., Munkittrick, K.R., Carey, J.H. et G.J. Van Der Kraak (éd.). *Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents*, St. Lucie Press, Delray Beach (FL), États-Unis, p. 549-555.

Culp, J.M., Podemski, C.L., Cash, K.J. et R.B. Lowell. 1996. Utility of field-based artificial streams for assessing effluent effects on riverine ecosystems. *J. Aquat. Ecosystem Health* 5: 117-124.

Culp, J.M. et R.B. Lowell. 1998. « Pulp mill effluent impacts on benthic communities and selected fish species in the Fraser River Basin ». In: Gray, C. et T. Tuominen (éd.). *Health of the Fraser River Aquatic Ecosystem, Vol. II*, DOE FRAP 1998-11, Environnement Canada, Ottawa (ON), Canada, p. 13-34.

Culp, J.M., Lowell, R.B. et K.J. Cash. 2000a. Integrating mesocosm experiments with field and laboratory studies to generate weight-of-evidence risk assessments for large rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 1167-1173.

Culp, J.M., Podemski, C.L., Cash, K.J. et R.B. Lowell. 2000b. A research strategy for using stream microcosms in ecotoxicology: integrating experiments at different levels of biological organization with field data. *J. Aquat. Ecosystem Stress and Recovery* 7: 167-176.

Culp, J.M., Podemski, C.L. et K.J. Cash. 2001. Interactive effects of nutrients and contaminates from pulp mill effluents on riverine benthos. *J. Aquat. Ecosystem Stress and Recovery*, sous presse.

Drake, J.A., Huxel, G.R. et C.L. Hewitt. 1996. Microcosms as models for generating and testing community theory. *Ecology* 77: 670-677

Dubé, M.G. et J.M. Culp. 1996. Growth responses of periphyton and chironomids exposed to biologically treated bleached kraft pulp mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 2019-2027.

Dubé, M.G. 2000. *Sources of contaminants in the bleached Kraft pulping process and their effect on the mummichog* (Fundulus heteroclitus). Thèse de doctorat, Université du Nouveau-Brunswick, Saint John (NB), Canada, 211 p.

Dubé, M.G. et D.L. MacLatchy. 2000. Endocrine responses of an estuarine fish *Fundulus heteroclitus* to final effluent from a bleached kraft pulp mill before and after installation of reverse osmosis treatment of a waste stream. *Environ. Toxicol. Chem* 19: 2788-2796.

Dubé, M.G. et D.L. MacLatchy. 2001. Identification and treatment of a waste stream at a bleached kraft pulp mill that depresses a sex steroid in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem* 20: 985-995.

Dubé, M.G., Culp, J.M., Cash, K.J., Glozier, N.E., MacLatchy, D.L., Podemski, C.L. et R.B. Lowell. 2001a. Artificial streams for environmental effects monitoring (EEM):

development and application in Canada over the past decade. *Wat Quality Res J Can*, sous presse.

Dubé, M.G., Culp J.C., MacLatchy, D.L., Gillis, G., Parker, R., Courtenay, S. et C. Gilman. 2001b. Utility of field-based artificial streams for assessing effects of pulp mill effluents on fish. *J. Aquat. Ecosystem Stress Recovery*, sous presse.

Environnement Canada. 1992. Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers, *Gazette du Canada*, Partie II, volume 126, numéro 11, p. 1967-1997.

Environnement Canada. 1995a. *Guide supplémentaire pour le recensement des poissons adultes dans l'étude de suivi des effets sur l'environnement aquatique visés par la* Loi sur les pêches du gouvernement fédéral, ESEE 2, Ottawa (ON), Canada.

Environnement Canada. 1995b. *Guide supplémentaire pour le recensement des invertébérés dans l'étude de suivi des effets sur l'environnement aquatique visés par la* Loi sur les pêches du gouvernement fédéral, ESEE 1, Ottawa (ON), Canada.

Environnement Canada. 1997. *Exigences en matière de suivi des effets sur l'environnement aquatique*, (révision SPE 1/RM/18), ESEE/1997/1, Environnement Canada, Bureau national de l'ESEE, Direction de la qualité de l'environnement et de la politique scientifique, Ottawa (ON), Canada.

Environnement Canada. 1998. *Guide technique pour l'étude du suivi des effets sur l'environnement aquatique par les fabriques de pâtes et papiers*, ESEE/1998/1, Environnement Canada, Bureau national de l'ESEE, Direction de la qualité de l'environnement et de la politique scientifique, Ottawa (ON), Canada.

Environnement Canada. 2001. *Metal Mining Technical Guidance Document for Aquatic Environmental Effects Monitoring*. ESEE/2001, sous presse, Environnement Canada, Bureau national de l'ESEE, Direction de la qualité de l'environnement et de la politique scientifique, Ottawa (ON), Canada.

Forbes, V.E. et T.L. Forbes. 1994. *Ecotoxicology in theory and practice*. Chapman and Hall, New York, États-Unis.

Fritz, E.S., Meredith, W.H. et V.A. Lotrich. 1975. Fall and winter movements and activity level of the mummichog *Fundulus heteroclitus*, in a tidal creek. *Chesapeake Sci.* 16: 211-215.

Gibbons, W.N., Munkittrick, K.R. et W.D. Taylor. 1998a. Suitability of small fish species for monitoring the effects of pulp mill effluent on fish. 1. Response of spoonhead sculpin exposed to bleached kraft mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, sous presse.

Gibbons, W.N., Munkittrick, K.R. et W.D. Taylor. 1998b. Suitability of small fish species for monitoring the effects of pulp mill effluent on fish. 2. Comparison of trout perch responses to white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, sous presse.

Green, R.H. 1993. Application of repeated measures designs in environmental impact and monitoring studies. *Austral. J. Ecology* 18: 81-98.

Heins, D.C. et F.G. Rabito Jr. 1986. Spawning performance in North American minnows: direct evidence of the occurrence of multiple clutches in the genus *Notropis*. *J. Fish. Biol.* 28: 343-357.

Hodson, P.V., B.R. Blunt et D.M. Whittle. 1984. "Monitoring lead exposure of fish », p. 87-98. In: *Contaminant Effects of Fisheries*. Cairns, V.W., P.V. Hodson et J.O. Nriagu, John Wiley and Sons, New York (NY).

Jenkins, R.E. et N.M. Burkhead 1993. *Freshwater fishes of Virginia.* American Fisheries Society, Bethesda (ML), États-Unis, 1079 p.

Jonasson, P.M. 1955. The efficiency of sieving techniques for sampling freshwater bottom fauna. *Oikos* 6: 183-207.

Kneib R.T. et A.E. Stiven. 1978. Growth, reproduction, and feeding of *Fundulus heteroclitus* (L.) on a North Carolina salt marsh. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 31: 121-140.

Leblanc, J. et C. M. Couillard. 1995. *Description de la période de reproduction d'un poisson sentinelle : le choquemort* (Fundulus heteroclitus) *de l'estuaire de la Miramichi.* Rapp. tech. can. sci. halieut. aquat. 2057: vii + 32p.

Leblanc, J., Coulliard, C.M. et J.F. Brethes. 1998. Modifications of the reproductive period in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) living downstream from a bleached Kraft pulp mill in the Miramichi Estuary, New Brunswick, Canada. *C.J.F.A.S.*, sous presse.

Lowell R.B., Culp J.M. et F.J. Wrona. 1995. Stimulation of increased short-term growth and development of mayflies by pulp mill effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 1529-1541.

Lowell R.B., Culp J.M., Wrona F.J. et M.L. Bothwell. 1996. « Effects of pulp mill effluent on benthic freshwater invertebrates: food availability and stimulation of increased growth and development ». In: Servos, M.R., Munkittrick, K.R., Carey, J.H. et G.J. Van Der Kraak (éd.). *Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents*, St. Lucie Press, Delay Beach (FL), États-Unis, p. 525-532.

Lowell R.B., Culp J.M. et M.G. Dubé. 2000. A weight-of-evidence approach for northern river risk assessment: integrating the effects of multiple stressors. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 1182-1190.

McIntire, C.D. 1993. « Historical and other perspectives of laboratory stream research ». In: G.A. Lamberti et A.D. Steinman (éd.), Research in artificial streams: applications, uses and abuses. *J. North Amer. Benth. Soc.* 12: 313-323.

Nelson, J.S. et M.J. Paetz. 1992. *The fishes of Alberta.* The University of Calgary Press, Calgary (AB), Canada.

Paine, M.D. 1990. Life history tactics of darters (*Percidae: Etheostomatiini*) and their relationship with body size, reproductive behaviour, latitude and rarity. *J. Fish Biol.* 37: 473-488.

Paine, M.D. 1996. Repeated measures designs. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1439-1441.

Peters, R.H. 1983. *The ecological implication of body size.* Cambridge University Press, New York, États-Unis, 329 p.

Podemski C.L. et J.M. Culp. 1996. « Nutrient and contaminant effects of bleached kraft mill effluent on benthic algae and insects of the Athabasca River ». In: Servos, M.R., Munkittrick, K.R., Carey, J.H. et G.J. Van Der Kraak (éd.). *Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents*, St. Lucie Press, Delay Beach (FL), États-Unis, p. 571-580.

Podemski C.L. 1999. *Ecological effects of a bleached kraft pulp mill effluent on benthic biota of the Athabasca River*. Thèse de doctorat, University of Saskatchewan, Saskatoon (SK), Canada, 292 p.

Rees, H.L. 1984. A note on mesh selection and sampling efficiency in benthic studies. *Mar. Poll. Bull.* 15: 225-229.

Resh V.H. et E.P. McElravy. 1993. « Contemporary quantitative approaches to biomonitoring using benthic macroinvertebrates ». In: Rosenberg, D.M. et V.H. Resh (éd.). *Freshwater biomonitoring and benthic invertebrates*, Chapman & Hall, NY, États-Unis, p. 159-194.

Roberts, W.E. 1988. The sculpins of Alberta. *Alberta Naturalist* 18: 121-127.

Scott, W.B. 1967. *Freshwater fishes of eastern Canada.* University of Toronto Press, Toronto (ON), Canada, 137 p.

Scott, W.B. et E.J. Crossman, 1973. *Poissons d'eau douce du Canada.* Office des recherches sur les pêcheries du Canada, Bull. 184, Ottawa (ON), Canada, 966 p.

Scrimgeour, G.J., Culp, J.M. et N.E. Glozier. 1993. An improved technique for sampling lotic invertebrates. *Hydrobiologia* 254: 65-71.

Shuter, B.J. 1990. Population-level indicators of stress. *Amer. Fish. Soc. Symposium* 8: 145-166.

Slack, K.V., Averett, R.C., Geeson, P.E. et R.G. Lipscomb. 1973. « Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples ». In: *Techniques of water-resources investigations of the United States Geological Survey*, Chapter 4A, Book 5, U.S. Department of the Interior, Geological Survey, Washington (D.C.), États-Unis, p. 1-165.

Snedecor, G.W. et W.G. Cochran. 1980. *Statistical methods.* 7e éd., Iowa State University Press, Ames (Iowa), États-Unis, 507 p.

Stewart-Oaten, A., Bence, J.R et C.W. Osenburg. 1992. Assessing effects of unreplicated perturbations: no simple solutions. *Ecology*, 67: 929-940.

Suess, M.J. 1982. *Examination of water for pollution control. A reference handbook.* Vol. 3. Biological, bacteriological and virological examination. Permagon Press, Oxford,

Angleterre.

Taylor B.R. et R.C. Bailey. 1997. *Évaluation technique des méthodes d'analyse et d'interprétation des données sur les invertébrés benthiques, rapport final.* Projet ETIMA 2.1.3, Ressources naturelles Canada, CANMET, Ottawa (ON), Canada, 26 p.

Weber, C.I. 1973. *Biological field and laboratory methods for measuring the quality of surface waters and effluents.* EPA-670/4-73-001, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati (OH), États-Unis.

Wiederholm, T. 1980. Use of benthos in lake monitoring. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.* 52: 537-547.

Wrona, F.J., J.M. Culp et R.W. Davies. 1982. Macroinvertebrate subsampling: A simplified apparatus and approach. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 1051-1054.

11.2 Utilisation de bivalves en cage comme méthode alternative de suivi

11.2.1 Introduction

La présente section décrit les méthodes utilisées au cours des études de bivalves en cage et fournit des renseignements détaillés sur les éléments suivants :

- contexte et approche générale des études de bivalves en cage;
- choix de l'espèce;
- plan d'étude;
- variables à mesurer;
- méthodes de mise en œuvre de l'étude;
- analyses des données;
- concentrations tissulaires;
- exigences en matière de rapports.

11.2.2 Contexte

En octobre 2000, le comité scientifique national de l'Étude de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) a recommandé le recours à des études de bivalves en cage comme méthode alternative scientifiquement valable lorsqu'il n'est ni pratique ni techniquement possible de mener des études de poissons. Cette recommandation était fondée sur l'arbre de décision figurant à l'annexe 1 du *Guide technique pour l'ESEE par les fabriques de pâtes et papiers* (Environnement Canada, 1998; figure 5.1). Le Sous-groupe sur les poissons pour le secteur des mines de métaux a également recommandé l'utilisation de bivalves en cage comme méthode alternative durant le processus de consultation multilatérale sur l'ESEE par les mines de métaux.

Au cours du premier cycle d'ESEE des fabriques de pâtes et papiers (de 1993 à 1996), les études de poissons ont produit d'assez bons résultats dans les milieux dulcicoles, mais on a rencontré un certain nombre de problèmes dans les milieux marins et estuariens. En février 1997, on a organisé un atelier pour étudier des solutions de remplacement au volet des études de poissons du programme d'ESEE (Courtenay *et al.*, 1998). L'une des solutions proposée était l'utilisation de bivalves en cage. Par la suite, deux études pilotes utilisant des bivalves en cage ont été menées dans des milieux marins : l'une en 1997, à Port Alice, sur l'île de Vancouver (Applied Biomonitoring, 2000), et l'autre en 1998, au havre de Pictou, en Nouvelle-Écosse (Andrews et Parker, 1999). D'après les résultats de ces deux études pilotes et d'autres études connexes utilisant des bivalves en cage, le comité scientifique et le sous-groupe sur les poissons du secteur des mines de métaux ont déterminé qu'une ESEE basée sur cette méthode pouvait produire des données de bonne qualité concernant les effets des effluents sur les poissons et satisfaire aux exigences de la réglementation.

Le présent guide technique décrit les procédures à suivre pour réaliser des expériences contrôlées à l'aide de bivalves en cage en suspension dans la colonne d'eau afin de vérifier la présence d'effets associés aux rejets industriels par une comparaison des mesures relevées dans une zone d'exposition et de celles prises dans des zones de référence. Cette approche constitue une solution de remplacement aux études de poissons et doit être envisagée par les fabriques lorsque les études de poissons se sont révélées infructueuses ou peu pratiques au cours des derniers cycles d'ESEE ou bien lorsqu'il y a des problèmes méthodologiques, dont des facteurs confusionnels ou des préoccupations liées à la sécurité.

En novembre 2000, l'American Society for Testing and Materials (ASTM) a approuvé une méthode pour la conduite d'études environnementales utilisant des bivalves en cage (Salazar et Salazar, 2000). Le présent guide repose sur cette méthode. On a également pris en considération d'autres études utilisant des bivalves sauvages et en cage au moment d'élaborer ce guide, qui vise à appliquer cette approche au cadre du programme d'ESEE. Le format du guide suit celui qui est utilisé pour les études de poissons.

Les bivalves sont des indicateurs biologiques utiles pour plusieurs raisons :

- ils sont relativement immobiles, de sorte que l'exposition aux contaminants est assurée et représentative de la zone d'exposition;

- ils sont abondants dans bon nombre de milieux marins, estuariens et dulcicoles, et il est relativement facile de les manipuler et de les échantillonner tout au long de l'année;

- la biologie de bon nombre de mollusques et de crustacés est bien connue, et un nombre considérable de recherches ont été menées sur les effets de l'exposition à différents facteurs d'agression environnementaux anthropiques et naturels sur ces organismes;

- on a montré que plusieurs espèces de bivalves accumulent facilement bon nombre de produits chimiques par différentes voies (eau, sédiments, nourriture) et présentent des effets sublétaux associés à l'exposition;

- la croissance des bivalves est relativement facile à mesurer et s'est révélée aussi sensible, sinon plus, que la mortalité chez des espèces d'essai standards telles que *Daphnia*, le vairon à grosse tête et la truite arc-en-ciel (voir Salazar et Salazar, 2000);

- les bivalves sont une ressource halieutique importante, et les régions de l'Atlantique et du Pacifique soutiennent toutes deux une industrie conchylicole qui présente un intérêt commercial; on y pratique aussi la récolte de mollusques et de crustacés à des fins commerciales et récréatives.

Comme les huîtres et les moules, les bivalves sont utilisés depuis le milieu des années 1970 dans le cadre de programmes de surveillance des moules, lesquels visent à suivre les tendances de la contamination chimique et à évaluer les effets des activités humaines sur les zones côtières et estuariennes. Ces programmes ont vu le jour aux États-Unis (Goldberg *et al.*, 1978) et ont depuis acquis une portée internationale (Jernelov, 1996).

11.2.3 Approche

L'approche des bivalves en cage offre un certain nombre d'avantages au chercheur qui mène une étude de suivi, notamment le contrôle et le réalisme expérimentaux, l'utilisation d'organismes naturellement présents dans le milieu d'étude et la connaissance de la période d'exposition. En utilisant des bivalves en cage plutôt que des populations résidentes, on peut réduire la variabilité des mesures biologiques en choisissant des individus de taille similaire qui possèdent la même histoire environnementale, ce qui augmente le pouvoir discriminant du test (Salazar et Salazar, 1995). Un nombre considérable d'études utilisant des bivalves en cage ont été menées au Canada, aux États-Unis et dans d'autres pays (voir Salazar, dans Stewart et Malley, 1997).

Les principales mesures terminales mesurées dans les ESEE utilisant des bivalves en cage sont la survie, la croissance et la condition. La reproduction est considérée comme un paramètre clé dans le suivi des populations de poissons mais, à l'heure actuelle, on ne dispose d'aucune méthode normalisée pour assurer le suivi de ce paramètre chez les bivalves en cage. Une fois que ces méthodes auront été établies, on effectuera une mise à jour du présent guide pour inclure des renseignements à ce sujet. Une analyse des tissus (teneurs en dioxines et en furannes peut être nécessaire, et des bivalves en cage peuvent être utilisés à cette fin. On peut également évaluer la bioaccumulation d'autres produits chimiques ou métaux pour faciliter l'interprétation des résultats ou encore utiliser ces produits pour la recherche de causes.

Le recours à des études de bivalves en cage pour remplacer les études de poissons présente certaines limites, notamment les suivantes (tiré de Salazar, dans Stewart et Malley, 1997) :

- effets possibles du stress causé par la transplantation chez les bivalves;
- perte de cages due à des imprévus, à l'entraînement involontaire par des navires ou à du vandalisme;
- coûts associés à la collecte, au tri et au déploiement des bivalves.

Malgré ces limites, l'approche basée sur l'utilisation de bivalves en cage est considérée comme une alternative possible dans les cas où l'on ne peut mener à bien une étude de poissons.

11.2.4 Choix de l'espèce

Bon nombre d'espèces de bivalves ont été utilisées pour évaluer la biodisponibilité ou les effets de produits chimiques dans des milieux marins, estuariens et dulcicoles.

Il faut choisir soigneusement l'espèce à utiliser dans les études de bivalves en cage et tenir compte au moins des aspects suivants :

- Les zones d'exposition et de référence présentent-elles des conditions similaires à celles de l'habitat naturel de l'espèce en ce qui concerne les limites de tolérance pour des facteurs naturels tels que la température, la salinité, la teneur en oxygène dissous et le pH?

- L'espèce est-elle naturellement présente dans la zone à évaluer?

- Est-ce que des auteurs indiquent que l'espèce peut accumuler le contaminant en question ou être sensible à celui-ci?

- L'évolution biologique de l'espèce est-elle bien connue en ce qui concerne le cycle de reproduction et les besoins aux différents stades de la vie?

- L'espèce est-elle menacée ou en danger de disparition?

- Dispose-t-on de stocks abondants facilement accessibles?

- L'espèce est-elle facile à manipuler sur le terrain?

Idéalement, on doit utiliser une espèce qui présente une distribution géographique étendue pour pouvoir comparer les résultats des essais entre les études.

11.2.4.1 Taxons utilisés le plus fréquemment

Les espèces utilisées le plus fréquemment dans les essais de toxicité sur le terrain en eaux canadiennes et considérées comme pertinentes pour les ESEE sont décrites ci-dessous et énumérées dans le tableau 8. De plus, ce tableau indique les limites de tolérance de chaque espèce à la température et à la salinité et fournit des données sur l'âge à la maturité, les périodes de frai et la distribution générale au Canada. D'autres espèces, telles que les myes (*Mya arenaria, Macoma balthica)* et les pétoncles, peuvent également être utilisées pour certaines applications. Il faut toutefois établir les conditions environnementales nécessaires et la sensibilité de ces autres espèces d'essai avant de les utiliser dans les ESEE.

Tableau 11-8: Taxons suggérés pour les études de bivalves en cage menées dans le cadre des ESEE

Espèces et références	Plage de température (°C)	Plage de salinité (parties par millier)	Données sur la reproduction	Distribution générale au Canada
Bivalves marins et estuariens				
Mytilus edulis (moule bleue) (Freeman *et al.*, 1994; Grout et Levings, 2000; Mucklow, 1996; Stewart, 1994; Salazar et Salazar, 2000; Newell, 1989).	-1,5 à 25	5 à 33	Maturité à 2 ans. Périodes de frai variables selon les populations; activité réduite tout au long de l'année; première période au début de l'été, deuxième à l'automne.	Côte de l'Atlantique
Mytilus trossulus (moule bleue du Pacifique) (Freeman *et al.*, 1994; Salazar et Salazar, 2000; Skidmore et Chew, 1985).	0 à 29	4 à 33	Maturité à 2 ans. Frai de juillet à septembre.	Côtes de l'Atlantique et du Pacifique
Crassostrea gigas (huître creuse du Pacifique) (Virginia Tech 2000; Waldock *et al.*, 1996).	4 à 24	25 à 35	Frai de juillet à août.	Côte du Pacifique
Bivalves dulcicoles				
Elliptio complanata (elliptio maigre de l'Est) (Beckvar *et al.*, 2000; Day *et al.*, 1990; Hinch et Green, 1989; MacMahon, 1991; Metaclfe-Smith *et al.*, 1996).	0 à 30	0 à 3	Maturité entre 6 et 12 ans. Frai essentiellement en juin et juillet; certaine activité de mai à septembre.	Est du Canada

Pyganodon (Anodonta) grandis (anodonte commun) (Clarke, 1973; Couillard *et al.*, 1995a, 1995b; Malley *et al.*, 1996).	0 à 30	0 à 3	Frai essentiellement en avril et mai; certaine activité jusqu'en août.	Intérieur et est du Canada
Anodonta kennerlyi (anodonte de l'Ouest) (BC Research Inc., 1998; Clarke, 1981; Stewart et Malley, 1997; Williams *et al.*, 1993).	0 à 30	Eau douce	Début du frai en août.	Alberta et Colombie-Britannique
Sphaeriidés (p. ex. *Musculium securis, Sphaerium rhomboideum, S. striatinum)* (Hornbach *et al.*, 1982; Mackie, 1978a, 1978b; Mackie et Flippance, 1983; Mackie *et al.*, 1974; Stephenson et Mackie, 1981).	10 à 25 (Écart optimal pour la croissance)	Eau douce	Cycle de vie généralement inférieur à un an; l'évolution biologique de bon nombre d'espèces est bien documentée; l'effort de reproduction peut être quantifié.	Distribution étendue au Canada
Dreissena polymorpha (moule zébrée) (Nichols, 2000; Stewart et Malley, 1997).	< 0 à 35	0 à 6	Maturité à 1 ou 2 ans. Frai de mai à septembre.	Espèce introduite; eaux de drainage des Grands Lacs et du fleuve Saint-Laurent.

(Format adapté de Salazar et Salazar, 2000)

11.2.4.2 Bivalves marins et estuariens

Mytilus sp. sont des bivalves intertidaux qui ont été utilisés avec succès dans des études de bivalves en cage menées dans des milieux marins et estuariens depuis la fin des années 1970. On s'en est beaucoup servi dans le cadre du programme de surveillance des moules, lequel vise à suivre les tendances de la contamination chimique et à évaluer les effets des activités humaines sur les zones côtières et estuariennes d'Amérique du Nord et d'ailleurs dans le monde (O'Connor, 1992; Jernelov, 1996). On trouve la moule bleue (*M. edulis*) et la moule bleue du Pacifique (*M. trossulus*) sur la côte atlantique du Canada, mais seulement la deuxième sur la côte ouest. On peut facilement confondre ces deux espèces dans les zones de

la côte atlantique où elles sont simultanément présentes (Freeman *et al.*, 1994; Mucklow, 1996). *M. edulis* a été utilisé avec succès dans les études pilotes sur les bivalves en cage menées dans le cadre de l'ESEE par les fabriques de pâtes et papiers sur la côte du Pacifique (Applied Biomonitoring, 2000) et sur la côte de l'Atlantique (Andrews et Parker, 1999). Il a également été largement utilisé comme indicateur biologique (Stewart et Malley, 1997; Salazar et Salazar, 2000). *M. trossulus* a été utilisé avec succès dans un certain nombre d'études de bivalves en cage dans les eaux côtières du Pacifique (Stewart et Malley, 1997).

Crassostea gigas est une espèce d'huître qui a été utilisée dans des études de transplantation dans des milieux marins et estuariens (Waldock *et al.*, 1996). La coquille de *C. gigas* est habituellement plus difficile à mesurer en raison de sa forme irrégulière et de ses protubérances.

11.2.4.3 Bivalves dulcicoles

Les bivalves de la famille des unionidés (tels que *Elliptio complanata* et *Pyganodon grandis* [anciennement *Anodonta grandis*]) sont des moules d'eau douce qui ont été utilisées dans un certain nombre d'études de bivalves en cage que l'on a menées pour examiner l'exposition dans la colonne d'eau et dans les sédiments. *Anodonta kennerlyi* est une moule d'eau douce de la même famille qui a récemment été utilisée dans une étude sur l'absorption du mercure dans un réservoir de la Colombie-Britannique par des moules en cage (BC Research, 1998).

Une mise en garde s'impose concernant l'utilisation des unionidés pour les études de bivalves en cage dans le cadre des d'ESEE. Des membres de cette famille ont été utilisés dans un certain nombre d'études de bivalves en cage où le paramètre à mesurer était la bioaccumulation, tandis que le présent guide technique est centré sur la survie, la croissance et la condition. La collecte d'un nombre suffisant de spécimens pour la réalisation d'une étude de bivalves en cage peut se révéler très difficile et mettre en danger des populations naturelles d'unionidés. Malheureusement, les espèces de cette famille ne sont pas cultivées à des fins commerciales et, par conséquent, ne sont pas disponibles auprès des conchyliculteurs. Les unionidés forment un groupe d'organismes caractérisés par une longue durée de vie et un faible taux de recrutement. Dans la nature, on trouve souvent des spécimens parvenus à maturité, de grande taille et à croissance lente, et les spécimens plus petits et à croissance plus rapide sont très difficiles à trouver.

Les sphaeriidés peuvent être considérés comme une solution de remplacement valable pour évaluer les différences dans la survie, la croissance, la condition et le taux de reproduction des bivalves dans les milieux récepteurs dulcicoles. Ils sont abondants, possèdent un cycle de vie de courte durée (généralement un an) et une distribution étendue et, contrairement aux unionidés, ne sont pas dépendants des poissons comme hôtes durant une partie de leur cycle de vie. En règle générale, ils sont également plus tolérants que les unionidés à de faibles concentrations de calcium dans l'environnement (Stewart et Malley, 1997), ce qui peut être un facteur important dans bon nombre de régions du Canada. Les sphaeriidés sont ovovivipares (Mackie, 1978a) et portent leurs petits dans des poches incubatrices situées sur leurs branchies jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être libérés dans l'eau (Mackie *et al.*, 1974). Ils ont été utilisés avec succès dans le passé pour évaluer les effets des effluents des fabriques

de pâtes et d'autres facteurs d'agression chimique sur la croissance et la natalité (Mackie, 1978b; Sandusky et Sparks, 1979; Stephenson et Mackie, 1981). Parmi les espèces potentiellement utiles pour l'ESEE figurent différents genres de *Sphaerium* (notamment *S. striatinum*) et de *Musculium* (notamment *M. securis*). Les différents taxons du genre *Pisidium* peuvent s'avérer difficiles à manipuler en raison de leur petite taille, et ils posent des problèmes de taxonomie aux non-spécialistes. D'autres recherches pourraient être nécessaires pour que l'on puisse démontrer l'utilité des bivalves de la famille des sphaeriidés pour l'ESEE.

Dreissena polymorpha est une moule d'eau douce à saumâtre, originaire d'Europe, qui a été récemment introduite dans le centre du Canada. Il s'agit d'une espèce fortement colonisatrice qui a causé des dommages économiques considérables par sa capacité à incruster complètement les surfaces solides; elle représente donc une nuisance sérieuse, et on ne doit pas l'utiliser dans les zones où elle est encore absente. *Dreissena* peut toutefois présenter un certain intérêt pour l'ESEE, car il s'agit un organisme filtreur sessile (fixé au substrat) à croissance rapide. Il peut être nécessaire, si on l'utilise, d'installer des cages spéciales ou d'adapter le plan d'étude, car le stade larvaire est planctonique et des " volontaires " peuvent apparaître spontanément dans les cages situées dans des zones touchées.

11.2.4.4 Sources

On peut obtenir des bivalves par prélèvement dans des populations naturelles ou auprès de conchyliculteurs. Lorsque c'est possible, on doit obtenir les bivalves d'un fournisseur commercial qui peut certifier ou garantir d'une quelconque manière que la culture provient d'une espèce unique et que la taxonomie est confirmée. Les sujets obtenus dans une installation commerciale possèdent une histoire environnementale bien connue, et on dispose de meilleures garanties qu'ils sont sains que dans le cas des spécimens sauvages. Dans toutes les études on doit fournir une forme quelconque de certificat pour assurer l'identité de l'espèce utilisée (une lettre du fournisseur ou une lettre de validation d'un taxinomiste).

Tous les spécimens utilisés dans une étude de bivalves en cage doivent provenir de la même population, car les réponses à l'exposition peuvent varier d'une population à l'autre au sein d'une même espèce. Si les populations sauvages constituent la seule source d'approvisionnement possible, les spécimens doivent être prélevés dans une zone non contaminée. Dans ce cas, on peut débarrasser les bivalves benthiques des sédiments à la main ou par un léger tamisage. Il faut prendre soin de ne pas suréchantillonner une population naturelle. Si les représentants de l'espèce choisie se fixent au substrat par un byssus, on doit utiliser un couteau ou des ciseaux pour retirer doucement le byssus de l'extérieur de la coquille de façon à ne pas endommager la glande byssogène interne. Il faut retirer doucement à la main ou à l'aide d'une brosse à poils doux ou d'un racloir tous les organismes épiphytes des coquilles des bivalves.

Certaines agences locales, provinciales ou fédérales peuvent exiger des permis de collecte pour les bivalves recueillis sur le terrain. Des permis de transplantation ou de conchyliculture

peuvent devoir être obtenus à l'avance auprès d'agences locales ou provinciales. En outre, si les cages sont susceptibles de gêner la navigation, un permis de la Garde côtière canadienne peut être nécessaire, de même qu'un avis aux navigateurs. Le processus d'obtention de permis doit être considéré dès les premières étapes de la planification de l'étude, car le traitement des demandes peut prendre de plusieurs semaines à quelques mois.

11.2.4.5 Taille et âge

Tous les sujets utilisés dans une étude de bivalves en cage devraient être de la même classe d'âge et de taille aussi uniforme que possible. La classe d'âge est plus difficile à déterminer chez les spécimens sauvages que chez les individus en culture, car les populations naturelles peuvent comprendre plusieurs classes d'âges, avec des rythmes de croissances différents selon les individus. On peut choisir des immatures, car ceux-ci possèdent d'ordinaire le meilleur potentiel de croissance. D'un autre côté, il peut être préférable d'utiliser des adultes qui viennent tout juste de déposer leurs œufs pour que la croissance durant la période d'exposition reflète la croissance dans les tissus somatiques et dans ceux des organes reproducteurs. Il est important de choisir des sujets qui ne se reproduiront pas et de frayeront pas durant la période d'exposition, car le frai pourrait compromettre les résultats. Les chercheurs doivent tenter de déterminer, à l'aide d'un sous-échantillon, à quelle étape du cycle de la reproduction se situent les sujets au début et à la fin de l'essai et de noter s'il y a eu frai.

11.2.4.6 Nombre d'organismes

On devrait effectuer une analyse de puissance (analyse exponentielle) pour déterminer le nombre minimum de bivalves à utiliser pour déceler un effet d'une ampleur donnée. On recommande d'élaborer le plan d'étude de façon à déceler une modification de 20 % de la croissance. Des ensembles de données destinés à faciliter la prédiction du nombre d'organismes nécessaires pourraient être disponibles auprès d'Environnement Canada.

Pour la mesure de la croissance, le nombre d'animaux requis par cage est fonction du plan de l'étude (p. ex., nombre de cages par station; se reporter au paragraphe 11.2.7.1 pour plus de détails sur ce point), de l'espèce utilisée, de l'âge des animaux ainsi que de la variabilité des réponses et des conditions de croissance à la station. Le nombre de bivalves nécessaires pour remplir les cages est fonction du plan de l'étude, notamment :

- du nombre de zones (zone d'exposition et zones de référence);
- du nombre de stations par zone;
- du nombre de points d'ancrage par station;

- du nombre de cages par point d'ancrage (si l'étude vise à déterminer l'exposition à différentes profondeurs dans la colonne d'eau);

- du nombre de bivalves par cage.

En outre, si on a besoin d'échantillons tissulaires pour fins d'analyse, on doit déterminer le nombre de sujets requis pour obtenir un échantillon suffisant pour les analyses chimiques.

Après qu'on a estimé le nombre minimum de sujets nécessaires pour obtenir la puissance désirée, on doit déterminer le nombre de bivalves à prélever, lequel devrait comprendre :

- le nombre total requis pour la préparation de l'essai (voir les points ci-dessus);

- plus le nombre requis pour la prise des mesures de référence au début de l'essai;

- plus le nombre requis pour compenser les pertes durant le transport ou la manipulation (on reconnaît les bivalves morts ou mourants à leur odeur ou à la lenteur avec laquelle la coquille se ferme en réaction au tapotement ou si elle ne se ferme pas du tout);

- ainsi que 50 à 100 % de plus pour tenir compte de la variabilité de taille et pour permettre l'obtention d'un échantillon de spécimens de la taille voulue.

11.2.4.7 Conditions de manipulation et de conservation

On trouvera ci-après un résumé des renseignements détaillés que donnent Salazar et Salazar (2000) sur les conditions de manipulation et de conservation des bivalves. Les organismes d'essai devraient être manipulés le moins possible et déployés le plus rapidement possible après leur collecte. Lorsque la manipulation est nécessaire, elle devrait être faite avec soin, doucement et rapidement de façon que les bivalves ne subissent pas de stress inutile. Les animaux devraient être conservés dans une eau courante, propre et bien aérée aussi longtemps que possible entre la collecte, le tri et le déploiement. Si on doit les transporter sur une grande distance, il importe de les garder humides et au frais en les plaçant dans une glacière avec des cryosacs (" ice packs ") ou de la glace mouillée (au fond de la glacière). Utiliser du papier journal ou des serviettes-éponges pour isoler les bivalves des cryosacs ou de la glace.

Avec l'utilisation des bivalves en cage dans le cadre de l'ESEE, on peut craindre que ceux-ci n'entrent en contact avec des produits chimiques utilisés dans les cryosacs, du chlore présent dans la glace mouillée ou d'autres produits chimiques qui pourraient provenir du papier journal ou des serviettes. Le meilleur moyen d'éviter d'avoir à conserver les sujets à basse température est de réduire le plus possible le temps écoulé entre la collecte et le déploiement. La source d'approvisionnement en bivalves doit être située le plus près possible des sites de déploiement. Si l'on prévoit de longs délais (plus d'un jour) entre la collecte et le déploiement, on devrait conserver les sujets dans de l'eau propre (non contaminée) et bien aérée à une température correspondant à l'extrémité inférieure de la plage de variation saisonnière pour l'espèce en question. En plaçant les bivalves dans de petits contenants

immergés dans un contenant plus grand où la température est contrôlée, on devrait pouvoir les maintenir à la température désirée.

11.2.5 Plan d'étude

Il est essentiel d'élaborer le plan d'étude approprié si l'on veut que les résultats soient probants. La méthodologie des études de bivalves en cage comprend un certain nombre d'éléments :

- plan d'échantillonnage;
- sélection des zones et des stations;
- réplication des stations et des cages d'une même station;
- moment et durée de l'étude;
- facteurs confondants ou de modification;
- mesures supplémentaires;
- configuration des cages;
- systèmes d'ancrage.

11.2.6 Plan d'échantillonnage

Cinq principaux plans d'échantillonnage sont recommandés pour les évaluations dans les milieux marins et dulcicoles :

- plan contrôle-impact (C-I);
- plan contrôle-impact multiple (C-IM);
- plan par gradient linéaire (GL);
- plan par gradient radial (GR);
- plan par gradient multiple (GM).

Les plans C-I et C-IM permettent de déterminer l'ampleur de la différence entre des zones homogènes exposées et non exposées, tandis que les plans GL, GR et GM permettent d'examiner les modifications d'un effet le long d'un gradient de concentration d'effluent. Les plans C-I et C-IM sont utilisés lorsqu'il y a peu de niveaux d'exposition qualitativement

différents. Il est recommandé d'utiliser plusieurs zones de référence plutôt que d'augmenter progressivement la taille des échantillons dans une seule zone (Environnement Canada, 1998). Les plans GL, GR et GM peuvent être utilisés lorsqu'il y a plusieurs niveaux d'exposition quantitativement différents (Paine, 2000); ils peuvent également être utiles pour distinguer les effets provenant d'autres sources qu'une fabrique de pâtes et papier. On trouvera des indications pour le choix du plan d'échantillonnage approprié dans les sections 5.1.3.3 et 6.1.5.4 du *Guide technique pour l'ESEE par les fabriques de pâtes et papiers* (Environnement Canada, 1998) et la section 5.6 du *Guide technique pour l'ESEE par les mines de métaux* (Environnement Canada, 2001).

Par exemple, dans les estuaires caractérisés par des régimes de marées et de courants complexes, l'approche C-IM pourrait être la plus appropriée. Une approche par gradient linéaire pourrait s'appliquer à un environnement récepteur fluvial, où l'écoulement est unidirectionnel.

Les plans C-I et C-IM nécessitent un certain degré de réplication dans les zones de référence et d'exposition. Pour les plans par gradient, il n'est pas nécessaire d'effectuer une réplication à chaque station, mais il importe d'établir un nombre approprié de stations pour distinguer les configurations spatiales associées au rejet d'effluent et les autres configurations spatiales dans l'environnement. On traite de la réplication à la section 11.2.7 ci-après. En bout de ligne, il incombe aux chercheurs d'élaborer des plans d'étude qui conviennent au site et qui soient scientifiquement valables, robustes et suffisamment sensibles.

11.2.6.1 Choix des zones et des stations

La section 3 du *Guide technique pour l'ESEE par les fabriques de pâtes et papiers* (Environnement Canada, 1998) et les sections 4.2.2 et 5.8 du chapitre 3 du *Guide technique pour l'ESEE par les mines de métaux* (Environnement Canada, 2001) fournissent des renseignements pour le choix de zones de référence multiples dans divers milieux récepteurs, et qui peuvent s'appliquer aux études faisant appel à des moules en cage. Les zones de référence doivent être aussi similaires que possible aux zones d'étude en ce qui concerne les éléments suivants :

- les conditions hydrodynamiques;
- la température;
- la salinité;
- la teneur en oxygène dissous;
- la disponibilité et la qualité de la nourriture.

L'utilisation de zones de référence multiples peut faciliter la reconnaissance de différences naturelles et de variations entre des zones non contaminées.

La zone d'exposition est définie par les caractéristiques du panache d'effluent. Le profil du panache, tel que décrit dans la section 2.2 du *Guide technique pour l'ESEE par les fabriques de pâtes et papier* (Environnement Canada, 1998) et la section 3.3 du *Guide technique pour l'ESEE par les mines de métaux* (Environnement Canada, 2001), doit fournir suffisamment de données pour permettre la modélisation des concentrations moyennes d'effluents en fonction de la distance par rapport à la source et la détermination du degré de mélange vertical dans la colonne d'eau. Cette information facilitera le choix des stations et de la profondeur du déploiement dans la colonne d'eau. On trouvera davantage d'information à ce sujet dans la section 11.2.7.1 ci-dessous.

Au moment de choisir les stations, on devrait tenir compte de la navigation et des activités récréatives dans les zones d'exposition et de référence pour réduire le plus possible les risques d'entraînement de cages ou de dommages dus au passage des navires et les risques de vandalisme. Les bassins d'amarrage et les zones où il y a un trafic maritime important peuvent également entraîner une exposition des bivalves à des produits pétroliers, à des substances anti-salissures et à d'autres produits chimiques associés à la navigation.

11.2.7 Réplication

11.2.7.1 Nombre de stations

L'emplacement des stations et les profondeurs auxquelles sont déployées les cages dans la zone d'exposition doivent être choisis de façon qu'un gradient d'exposition au panache d'effluent soit représenté. Au moment de choisir les stations, on doit considérer avec attention un certain nombre de facteurs d'interférence potentiels, dont les suivants.

- Dans les milieux marins et estuariens, le panache peut être flottant, de sorte qu'une mince couche d'effluent non salé surmonte une couche d'eau salée plus dense.

- Dans les zones soumises à l'action des marées, le mélange de l'effluent aux eaux peut obéir à des mécanismes assez complexes, et on ne peut être certain des concentrations moyennes auxquelles les bivalves sont exposés. Dans ces situations, on doit envisager de répartir les stations dans la zone d'exposition à la fois en amont et en aval du point de rejet.

- Dans les embouchures des cours d'eau, le panache d'effluent peut être assez long et étroit, de sorte qu'il est difficile d'obtenir une réplication valable des stations à l'intérieur du panache (c.-à-d. dans sa section transversale).

Pour ces raisons et pour d'autres énoncées ci-après, il peut être préférable d'élaborer les études de bivalves en cage de façon à évaluer simplement la distance par rapport au point de rejet plutôt que les concentrations d'effluent. Cette approche demeure conforme à l'un des

objectifs de l'ESEE qui est d'évaluer l'ampleur et l'étendue géographique des effets qui peuvent être associés au rejet d'effluents.

11.2.7.2 Réplication et pseudoréplication

Le nombre de stations répétées doit être déterminé en fonction du plan d'échantillonnage et des objectifs de l'ESEE. Ce nombre, et le nombre de sous-échantillons dans ces stations, seront déterminés par une analyse de puissance. La répartition et la distribution des stations répétées sont tributaires du plan d'échantillonnage. On trouvera à la section 6.1.5.5 du *Guide technique pour l'ESEE par les fabriques de pâtes et papiers* (Environnement Canada, 1998) et aux sections 4.4.1.1 et 5.11 du *Guide technique pour l'ESEE par les mines de métaux* des renseignements sur l'utilisation de l'analyse de puissance.

Tout examen de la réplication dans une étude sur le terrain doit tenir compte du problème de la pseudoréplication, qu'Hurlbert (1984) définit comme l'utilisation de la statistique déductive pour vérifier la présence d'effets du traitement à l'aide de données d'expériences dans lesquelles les traitements ne sont pas répétés (bien que les échantillons le soient) ou dans lesquelles les répétitions ne sont pas statistiquement indépendantes. Dans la terminologie de l'analyse de variance (ANOVA), il s'agit de la vérification de la présence d'effets du traitement avec un terme d'erreur qui ne convient pas à l'hypothèse à vérifier (voir l'encadré 1 pour plus de détails). On trouvera un examen plus approfondi des questions soulevées par Hurlbert (1984) et du problème de la pseudoréplication à la section 3 du *Guide technique pour l'ESEE par les fabriques de pâtes et papiers* (Environnement Canada, 1998).

Le problème de la pseudoréplication continuera d'être un enjeu pour les expériences sur le terrain dans un avenir prévisible. Pour l'ESEE, où un courant d'effluent unique est rejeté dans le milieu récepteur, on pourrait affirmer qu'une véritable réplication est impossible et que tous les échantillons sont corrélés entre eux de telle façon que les fondements de la statistique déductive ne sont pas respectés. Il reviendra aux concepteurs des études d'élaborer des approches pour l'ESEE qui réduisent le plus possible le risque de formuler des conclusions erronées à cause des effets secondaires potentiellement trompeurs de la pseudoréplication (voir le tableau 1 dans Hurlbert, 1984).

Il semble que la meilleure approche consiste à évaluer (au moyen de l'analyse de variance ou d'autres techniques statistiques) s'il existe des différences significatives entre les stations qui sont réparties stratégiquement autour du point de rejet d'un effluent. Toute corrélation intéressante qui pourrait être établie entre les différences significatives et la distance par rapport au point de rejet (ou la concentration attendue d'effluent) devrait également être notée. Il pourrait être nécessaire de mener d'autres études pour attribuer les différences mesurées à l'effluent.

Cette limite est bien reconnue dans le contexte général de l'ESEE et s'applique tout autant aux études de poissons qu'aux études d'invertébrés benthiques.

Encadré 1 Pseudoréplication dans le contexte d'Hurlbert (1984)

Pour examiner la pseudoréplication, on doit se reporter à l'un des objectifs de l'ESEE qui est de mesurer *l'ampleur et l'étendue géographique* de chacun des effets de l'effluent sur des aspects spécifiques du milieu récepteur et sur le biote. Un point important sous-jacent à cet objectif est que les effets qu'on veut déceler sont propres à la fabrique étudiée. Chaque combinaison de fabrique et de milieu récepteur est unique; il faut donc être prudent lorsqu'on généralise à d'autres milieux récepteurs les effets environnementaux associés à un effluent particulier. Un autre point implicite dans l'objectif des ESEE est qu'on veut savoir s'il existe une différence statistiquement significative dans l'environnement ou le biote, laquelle est causée par l'effluent de la fabrique à divers emplacements situés à proximité du point de rejet.

Hurlbert (1984) définit deux catégories d'expériences : les premières, par *mesure*, consistent uniquement à prendre à des mesures en un ou plusieurs points de l'espace ou du temps; les deuxièmes, par *manipulation*, consistent à appliquer un ou plusieurs traitements dans le but d'effectuer une ou plusieurs comparaisons. Ces dernières expériences sont élaborées de façon que différentes unités expérimentales reçoivent différents traitements, lesquels sont ou peuvent être assignés aléatoirement aux unités expérimentales. Dans le contexte de l'ESEE, on choisit de considérer les emplacements comme des unités expérimentales plutôt que simplement des cages dans lesquelles se trouvent un ou plusieurs bivalves. En prenant cette décision, on considère l'ESEE comme une étude par mesure ayant pour objectif d'évaluer si une propriété biologique (telle que la survie ou la croissance des bivalves) est différente d'un emplacement à l'autre.

Hurlbert (1984) illustre son propos à l'aide de plusieurs exemples hypothétiques d'expériences. Nous nous appuyons particulièrement sur l'*exemple 3*, où il compare la décomposition de feuilles contenues dans un filet à deux endroits différents (sur les isobathes de 1 et 10 m d'une étendue d'eau). Voici ce qu'indique Hurlbert :

" … par paresse, nous plaçons les huit filets en un point unique de chaque isobathe. Il sera encore justifié d'effectuer un test d'hypothèse sur les données qui en résulteront. Cependant, et ce point est central dans cet essai, si une différence significative est décelée, elle prouvera uniquement qu'il existe une différence entre les deux *emplacements*; l'un " se trouvant à être " un point sur l'isobathe de 1 m, et l'autre " se trouvant à être " un point sur l'isobathe de 10 m. On ne peut interpréter cette différence significative comme la démonstration d'une différence entre les deux *isobathes*, c'est-à-dire comme la preuve d'un " effet du traitement ". Pour autant que nous le sachions, cette différence significative que nous avons observée n'est pas plus importante que celle que nous aurions décelée si nous avions placé les deux séries de huit filets à deux endroits sur la *même* isobathe.

" Si nous insistons pour interpréter une différence significative de même nature que celle de l'exemple 3 comme un " effet du traitement ", nous effectuons ce que j'appelle une *pseudoréplication*. " [traduction libre]

11.2.7.3 Application de la réplication au plan d'étude

On suggère de mesurer plusieurs paramètres dans les études de bivalves en cage : la survie, la croissance (modification de la longueur ou du poids humide des sujets), le poids frais des tissus mous et la condition. Plusieurs configurations différentes de cages et de bivalves peuvent être utilisées pour mesurer ces mesures terminales sur une série de sujets déployés à différents endroits sur le terrain. L'une des approches possibles est exposée ci-après et illustrée dans l'encadré 2; il convient toutefois de noter qu'une grande variété d'options peuvent être viables selon les conditions propres à chaque site.

Supposons que l'on déploie plusieurs groupes de 100 bivalves dans une zone de référence et à des distances de 50, 200 et 400 m du point de rejet d'un effluent dans la zone d'exposition. En utilisant des nombres aléatoires, on produit un ensemble de données hypothétiques qui représentent ce scénario. On peut considérer ces données comme représentant le poids frais des tissus mous des bivalves à la fin de la période d'exposition (voir l'encadré 2). Pour constituer cet ensemble de données, on a produit quatre ensembles de 100 nombres aléatoires possédant respectivement une moyenne de 13 (zone de référence), de 10 (50 m), de 11 (200 m) et de 12 (400 m) et un écart-type de 2. Par la suite, chaque ensemble de 100 nombres a été divisé en cinq groupes de 20 qui représentent les bivalves déployés à chaque point d'ancrage. Remarquez que cette approche considère que les points d'ancrage sont des réplicats et que les bivalves déployés à chaque point d'ancrage sont des sous-échantillons (et non de véritables réplicats).

Trois plans d'étude possibles sont évalués à l'aide de ces données. Dans le premier, les groupes de 100 bivalves correspondant à chacune des distances sont considérés comme des réplicats (bien que ce soit techniquement incorrect) et l'analyse de variance (ANOVA) qui en résulte possède trois degrés de liberté pour la distance et 396 degrés de liberté pour l'erreur expérimentale. Le problème de ce plan d'étude réside dans le fait qu'une seule estimation de la survie est disponible à chaque distance, bien que les tests d'hypothèse concernant les effets de la zone sur la croissance soient valides (ANOVA 1).

Dans le deuxième plan d'étude (ANOVA 2), les bivalves sont déployés dans des cages par groupe de 20, et chaque bivalve dans chaque cage est traité comme un sous-échantillon. Dans cette analyse, on dispose de cinq estimations de la survie pour chaque distance, et l'analyse de la variance (qui décompose l'erreur de sous-échantillonnage et considère que l'erreur quadratique moyenne pour les cages à l'intérieur de la distance est le terme d'erreur approprié pour la vérification des effets de la distance) est plus puissante que dans le cas précédent, bien qu'elle soit fondée sur les mêmes données.

Dans le troisième plan d'étude (ANOVA 3), les bivalves sont à nouveau déployés dans des cages par groupe de 20 mais, pour chaque cage, seul le taux de croissance moyen à l'intérieur de la cage est estimé. Dans cette analyse, le test concernant les effets de la distance possède exactement la même puissance que celui utilisé dans le deuxième plan d'étude sur des sous-échantillons.

Encadré 2 – Poids sec des tissus de bivalves en fonction de la distance par rapport au point de rejet de l'effluent des fabriques (synthèse des données)

50 m					200 m				
14.53	11.77	10.38	8.70	11.06	8.65	10.74	9.07	8.34	12.13
6.44	10.66	10.71	6.90	12.25	14.69	8.34	9.78	11.57	10.47
9.43	9.40	11.47	9.54	11.33	10.46	11.57	10.64	15.26	9.33
10.22	10.07	11.77	7.44	7.86	11.76	8.92	10.87	12.11	11.12
9.13	5.99	9.11	7.86	8.62	10.43	13.75	7.98	12.03	13.90
9.51	10.58	9.90	10.50	10.50	12.51	11.62	13.53	12.95	13.42
11.32	7.63	10.70	13.17	10.88	12.62	12.38	11.12	7.03	8.70
9.21	10.38	14.57	6.26	10.11	11.97	11.56	12.73	12.82	10.75
14.79	6.91	7.21	10.31	7.92	10.15	6.87	13.77	12.57	11.52
8.68	8.23	10.85	7.19	9.61	13.85	10.65	12.96	7.28	12.20
9.49	13.16	9.62	10.68	9.20	14.27	13.75	7.39	9.57	7.22
8.49	8.18	6.70	7.30	8.81	9.99	10.24	12.02	9.87	8.65
11.13	7.66	14.63	7.76	7.92	10.21	11.11	9.42	9.36	14.28
12.07	10.39	7.84	12.03	12.61	11.35	8.36	12.80	9.03	10.95
13.27	9.32	12.03	10.66	10.71	7.81	7.08	13.55	11.46	15.76
11.75	10.81	5.43	7.91	7.69	9.93	10.94	12.44	11.71	12.31
9.72	12.35	8.52	10.19	10.75	14.50	12.05	8.77	10.02	13.71
9.61	7.63	13.00	8.52	13.98	9.56	9.35	8.75	10.85	7.08
10.12	10.73	10.41	10.27	10.40	9.02	12.39	10.66	14.98	9.76
5.65	9.07	11.27	9.89	9.33	9.94	10.49	12.71	10.61	12.78
10.228	**9.546**	**10.306**	**9.154**	**10.077**	**11.184**	**10.608**	**11.048**	**10.971**	**11.302**

400 m					Reference				
11.02	11.01	8.69	10.90	9.93	17.18	15.75	7.76	15.34	11.59
13.22	10.99	9.91	12.00	13.77	13.22	13.72	12.84	13.87	10.75
12.30	13.98	13.31	11.14	12.09	11.77	12.47	12.29	11.99	10.54
9.10	10.32	9.48	11.36	12.38	14.58	14.02	9.73	11.85	14.51
12.12	12.30	12.34	14.42	11.12	13.11	16.24	12.80	12.50	15.52
11.90	12.00	9.28	8.51	11.80	13.60	12.65	11.64	12.37	11.31
14.33	12.13	12.15	9.40	11.57	15.27	11.78	13.77	10.25	14.00
10.32	9.19	11.82	14.16	10.65	13.67	14.43	14.40	12.45	10.99
13.10	9.43	12.12	12.07	11.57	15.34	13.64	15.73	16.51	11.67
13.16	12.90	11.84	11.72	9.79	8.81	15.83	15.91	9.54	15.05
9.36	11.04	10.31	13.93	9.65	17.26	12.52	10.75	10.13	10.53
13.51	10.75	11.15	12.32	13.45	13.53	14.02	16.12	12.56	13.04
13.96	14.54	10.50	8.41	8.03	9.82	12.42	15.16	12.42	13.94
11.81	11.93	15.36	14.90	12.81	11.55	15.70	14.04	9.90	12.86
14.24	9.25	14.85	10.15	10.16	15.61	12.16	11.25	17.93	10.17
11.82	10.83	13.74	9.80	13.18	11.17	9.41	11.29	13.74	13.99
16.00	12.65	13.19	10.83	13.10	10.14	15.03	12.54	11.92	13.81
12.42	10.32	9.45	12.74	8.68	9.95	13.21	9.47	16.02	12.18
11.38	14.03	10.97	13.90	13.24	12.39	8.95	15.58	11.13	11.15
11.88	15.04	14.50	13.28	14.18	15.81	11.38	10.07	15.75	11.17
12.348	**11.732**	**11.748**	**11.798**	**11.558**	**13.189**	**13.266**	**12.657**	**12.909**	**12.439**

ANOVA 1 : Chaque bivalve considéré comme un véritable réplicat

Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance	Rapport de var.	P
Distance	492.34	3	164.11	39.46	<0.0001
Erreur	1647.04	396	4.16		

Somme des carrés	Degré de liberté	Variance	Rapport de var.	P
492,34	3	164,11	62,40	< 0,0001
42,13	16	2,63		
1604,91	380	4,22		

onnage)

Source
Distance
Erreur

a distance est le terme d'erreur approprié dans l'analyse avec sous-échantillons.

ANOVA 3 Cages considérées comme des réplicats; valeures moyen
pour la croissance utilisées dans l'analyse

Source	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance	Rapport de var.	P
Distance	24,62	3	8,21	62,40	< 0,0001
Erreur	2,11	16	0,13		

Le but de cet examen de la réplication est de démontrer que, pour l'ESEE, il peut être avantageux de déployer des cages-réplicats contenant plusieurs bivalves à chaque station et de considérer seulement le rendement moyen à l'intérieur de chaque cage. Cette approche permet en outre de compenser la perte éventuelle d'une ou de plusieurs cages et peut simplifier la construction et le déploiement des cages. Tant que la portée du test de l'hypothèse statistique demeure limitée à la vérification de différences significatives entre les zones (sans attribuer uniquement les effets à l'exposition à l'effluent), la réplication et l'analyse statistique sont valides.

On suggère, en règle générale, de déployer des cages de 20 sujets pour mesurer la survie et au moins cinq cages par station pour mesurer la croissance. Il convient d'utiliser une seule cage, et non cinq, par point d'ancrage, car celui-ci constitue l'unité de réplication statistique la plus appropriée. On incite toutefois les intervenants à explorer la puissance et la robustesse de plans d'étude potentiels en utilisant des données de synthèse (ou des données empiriques lorsqu'elles sont disponibles) comme partie intégrante du processus de planification de l'étude afin de déterminer le nombre minimum de sujets requis.

11.2.7.4 Moment et durée de l'étude

Le moment de l'étude doit répondre aux caractéristiques suivantes.

- Il coïncide avec une période de forte croissance dans les populations naturelles de sorte que la croissance soit la plus importante possible et que les différences observées dans le taux de croissance selon les traitements soient plus mesurables.

- Il ne coïncide pas avec une période de frai si les bivalves d'essai sont des adultes.

La durée d'exposition devrait être de 60 à 90 jours (voir l'examen de ce point dans Salazar et Salazar, 2000). Cette durée devrait être suffisante pour que les effets sur la survie et la croissance puissent se manifester.

11.2.7.5 Facteurs confondants ou de modification et mesures supplémentaires

Les résultats des études de bivalves en cage seront tributaires, au moins en partie, de facteurs naturels tels que la température, la disponibilité de la nourriture, d'autres propriétés physiques et chimiques du milieu d'essai, l'espèce choisie, la condition des organismes d'essai, la méthode d'exposition et les manipulations subies par ces organismes. Les zones d'exposition et de référence devraient être aussi similaires que possible en ce qui concerne les facteurs énumérés ci-après pour réduire le plus possible les différences confusionnelles. Il peut être utile de mesurer certains des facteurs pour faciliter l'interprétation des résultats. Ces facteurs sont présentés brièvement ci-dessous avec un examen plus détaillé dans la section 6 de Salazar et Salazar (2000).

La prise en considération du **cycle de vie** des organismes d'essai est essentielle au succès de l'étude. L'élément le plus important dont il faut tenir compte est le cycle de reproduction, car il peut interférer avec la croissance et entraîner une confusion des résultats. Il importe de mener les essais avec des sujets qui ne risquent pas de frayer durant la période d'exposition. Si l'on utilise des bivalves immatures, on ne rencontre pas ce problème.

La **température** du milieu récepteur peut influer sur l'assimilation des composés chimiques, la survie et la croissance. On peut surveiller la température de l'eau durant la période d'exposition pour déterminer son incidence possible sur les résultats de l'essai et pour évaluer la similarité des températures entre les zones. Les dispositifs de surveillance continue de la température sont peu coûteux (environ 100 à 120 dollars chacun) et faciles à trouver. On peut installer un dispositif de surveillance par station en le fixant à une cage.

Le **manque d'acclimatement** à la qualité de l'eau dans les zones d'essai peut causer des interférences. Il peut être nécessaire d'acclimater graduellement les sujets aux conditions d'essai, notamment si les conditions qui règnent au site de collecte sont très différentes de celles que l'on trouve dans les zones d'essai.

La **disponibilité de la nourriture** est importante parce qu'elle entre en jeu dans la survie, la croissance, la condition et l'assimilation des composés chimiques. On peut échantillonner la nourriture durant la période d'exposition pour faciliter l'interprétation des résultats. Les mesures peuvent comprendre un ou plusieurs des éléments suivants (selon le mode d'alimentation de l'espèce choisie) : chlorophylle-*a*, carbone particulaire ou organique, solides en suspension.

La **vitesse des courants** peut avoir un effet sur le taux de croissance des bivalves. Il est important que les chercheurs possèdent une compréhension générale de la configuration et de la vitesse des courants dans chaque zone et à chaque station pour faciliter l'interprétation des résultats. On peut envisager d'utiliser des courantomètres aux stations caractérisées par un régime simple. Par contre, là où il existe un régime complexe, les courants peuvent être difficiles à évaluer avec cette méthode. Dans ce cas, une compréhension qualitative des courants est suffisante.

La **salinité** revêt une importance particulière dans les zones estuariennes où elle peut varier de nulle près de l'embouchure du cours d'eau à 33 parties par millier à une courte distance de celle-ci. La salinité peut également varier dans la même proportion à certains endroits durant le cycle des marées. Dans ces situations, on devrait choisir une espèce qui présente une plage étendue de tolérance à la salinité, bien qu'il n'y ait aucune garantie que la survie ne sera pas affectée (voir Grout et Levings, 2000). On peut mesurer la salinité à chaque station en utilisant un dispositif de surveillance *in situ*. On devrait observer les conditions locales pour déterminer si des fluctuations de la salinité sont probables.

Les cages des bivalves peuvent s'encrasser en raison de la croissance d'organismes végétaux ou animaux dans les échancrures littorales très productives. L'**encrassement excessif** peut réduire ou interrompre la circulation de l'eau dans les cages, créant ainsi des conditions extrêmement stressantes pour les organismes d'essai. Si l'on prévoit de rencontrer de telles conditions, il importe de vérifier l'encrassement des cages durant la période d'exposition et retirer les organismes qui s'y sont fixés à la main ou à l'aide d'une brosse à poils durs.

La **variabilité des concentrations de produits chimiques** dans la colonne d'eau en raison de la présence de rejets intermittents peut compliquer l'estimation des concentrations dans la zone d'exposition. La surveillance des volumes rejetés et des concentrations d'indicateurs chimiques dans l'effluent durant la période d'exposition faciliteront l'estimation de l'exposition et l'interprétation des résultats. Par exemple, on peut mesurer les concentrations de produits chimiques dans les eaux réceptrices au début et à la fin de l'essai pour confirmer la présence ou l'absence d'effluent et d'autres influences chimiques dans la zone où sont installées les cages. On trouvera des renseignements sur les indicateurs chimiques à la section 2.2.2 du *Guide technique pour l'ESEE par les fabriques de pâtes et papiers* (Environnement Canada, 1998) et la section 4.4.1.1.2 du *Guide technique pour l'ESEE par les mines de métaux* (Environnement Canada, 2001).

11.2.7.6 Configuration des cages

On suggère d'utiliser des cages munies de compartiments individuels pour pouvoir suivre chacun des bivalves tout au long de l'étude. La largeur de maille devrait être aussi grande que possible pour permettre une circulation maximale de l'eau, mais suffisamment petite pour contenir les animaux d'essai. Les sujets sont placés dans les compartiments de façon à suivre la survie, la croissance et la condition pour chacun.

Salazar et Salazar (2000) décrivent diverses configurations de cages. On suggère d'utiliser des cages plates (c.-à-d. à deux dimensions), comme l'illustre la figure 1, car elles possèdent un certain nombre d'avantages pratiques (M. Salazar, comm. pers.), notamment :

- elles contiennent une couche unique de bivalves qui sont faciles à manipuler durant la préparation, le déploiement et la récupération;
- elles peuvent être facilement adaptées pour contenir un nombre variable de bivalves;

- elles peuvent être rapidement et facilement empilées dans un espace restreint durant la préparation et le transport vers les sites de déploiement.

Les tubes en PVC conviennent bien pour la fabrication des cages. Le PVC devrait être de très bonne qualité et utilisable dans l'eau. Les tubes devraient être trempés dans l'eau courante, douce ou salée, pendant au moins 24 heures avant leur utilisation pour le retrait des produits chimiques volatils ou solubles dans l'eau. D'autres matériaux sont décrits dans Salazar et Salazar (2000; section 9).

Les organismes d'essai seront placés dans des filets et séparés à l'aide d'attaches de plastique ou de tout autre matériau approprié. On devrait laisser suffisamment d'espace dans chaque compartiment pour permettre aux sujets de croître durant la période d'exposition.

Les dimensions finales des cages sont tributaires de la taille des organismes d'essai et du nombre de bivalves par cage. Habituellement, les cages destinées aux espèces comme les moules et les myes mesurent 10 à 15 cm de diamètre, avec une largeur de maille de 5 mm. Chaque filet devrait être suffisamment long pour contenir le nombre désiré de bivalves et pour permettre la fixation au cadre de PVC. La longueur du cadre devrait excéder de 5 cm celle des boudins en filet de bivalves, et sa largeur devrait dépasser de 5 cm de chaque côté du boudin adjacent au cadre.

Pour les déploiements de myes en milieu dulcicole, les chercheurs ont utilisé une grande variété de configurations de cages. Il incombe au responsable de l'étude de s'assurer que la configuration des cages convient à l'espèce choisie et au milieu récepteur.

11.2.7.7 Systèmes d'ancrage

Pour suspendre les cages dans la colonne d'eau, on peut les attacher à des lignes munies d'ancres ou de poids à l'extrémité inférieure (p. ex., des maillons de chaîne en fer) et de bouées de surface ou de subsurface à l'extrémité supérieure. Il importe de tenir compte des facteurs suivants au moment du déploiement des cages (tiré de Salazar et Salazar, 2000) :

- la disponibilité d'un bateau de taille appropriée pour le transport des cages, de leurs lignes d'ancrage, de leurs bouées et de leurs ancres;

- la hauteur des marées (pour s'assurer que les cages demeurent à la profondeur voulue tant à marée basse qu'à marée haute);

- la pente et la nature du fond (pour s'assurer que les cages ne glissent pas au bas d'une forte pente durant la période d'exposition);

- les activités récréatives et de navigation aux alentours des cages.

Un certain nombre de configurations de points d'ancrage sont décrites dans Salazar et Salazar (2000; section 9) et dans les rapports d'études pilotes (Applied Biomonitoring, 2000; Andrews et Parker, 1999). La figure 6 illustre un système d'ancrage pour une cage en forme

de cube (tiré de Andrews et Parker, 1999). Il peut être utile de fixer une ligne à chacune des cages pour faciliter la récupération à la fin de la période d'exposition.

11.2.8 Variables à mesurer

Les variables d'essai qui doivent être mesurées au cours des études de bivalves en cage menées dans le cadre de l'ESEE sont la survie, la croissance et la condition; elles sont décrites de façon plus détaillée ci-après. On trouvera au tableau 9 un modèle de rapport pour l'enregistrement des données brutes et des résultats relatifs à la survie et à la croissance. À l'heure actuelle, le comité scientifique de l'ESEE ne recommande pas la mesure de la condition reproductive pour les raisons exposées ci-après.

Les membres du comité scientifique de l'ESEE ne pensent pas que l'on dispose, à l'heure actuelle, de méthodes uniformes et à point pour l'évaluation de la condition reproductive des bivalves. Ils pensent qu'il faudra mener davantage de recherches et acquérir de nouvelles connaissances dans ce domaine avant de pouvoir intégrer ce type de mesure aux ESEE. Un exemple de mesure de la condition reproductive est l'indice gonadique utilisé par Mucklow (1996) pour des moules (*Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus)* et par le Conseil du golfe du Maine sur le milieu marin (GMCME, 1992), également pour des moules. L'indice gonadique représente le ratio entre le poids sec des gonades et le poids humide des tissus (GMCME, 1992).

On trouvera dans Salazar et Salazar (2000; section 11) des indications sur la façon d'analyser les tissus des bivalves. L'analyse des concentrations de dioxines et de furannes dans les tissus peut être obligatoire pour les fabriques de pâtes et papiers si l'une ou l'autre des conditions suivantes s'applique :

a) les concentrations de dioxines et de furannes dans l'effluent ont excédé les limites prescrites dans le *Règlement sur les dioxines et les furannes chlorés dans les effluents des fabriques de pâtes et papiers*;

b) l'effluent a renfermé des concentrations mesurables de 2,3,4,8-TCDD ou de 2,3,7,8-TCDF au sens du *Règlement sur les dioxines et les furannes chlorés dans les effluents des fabriques de pâtes et papiers*;

c) un effet sur les tissus des poissons a été rapporté au cours du dernier cycle d'ESEE.

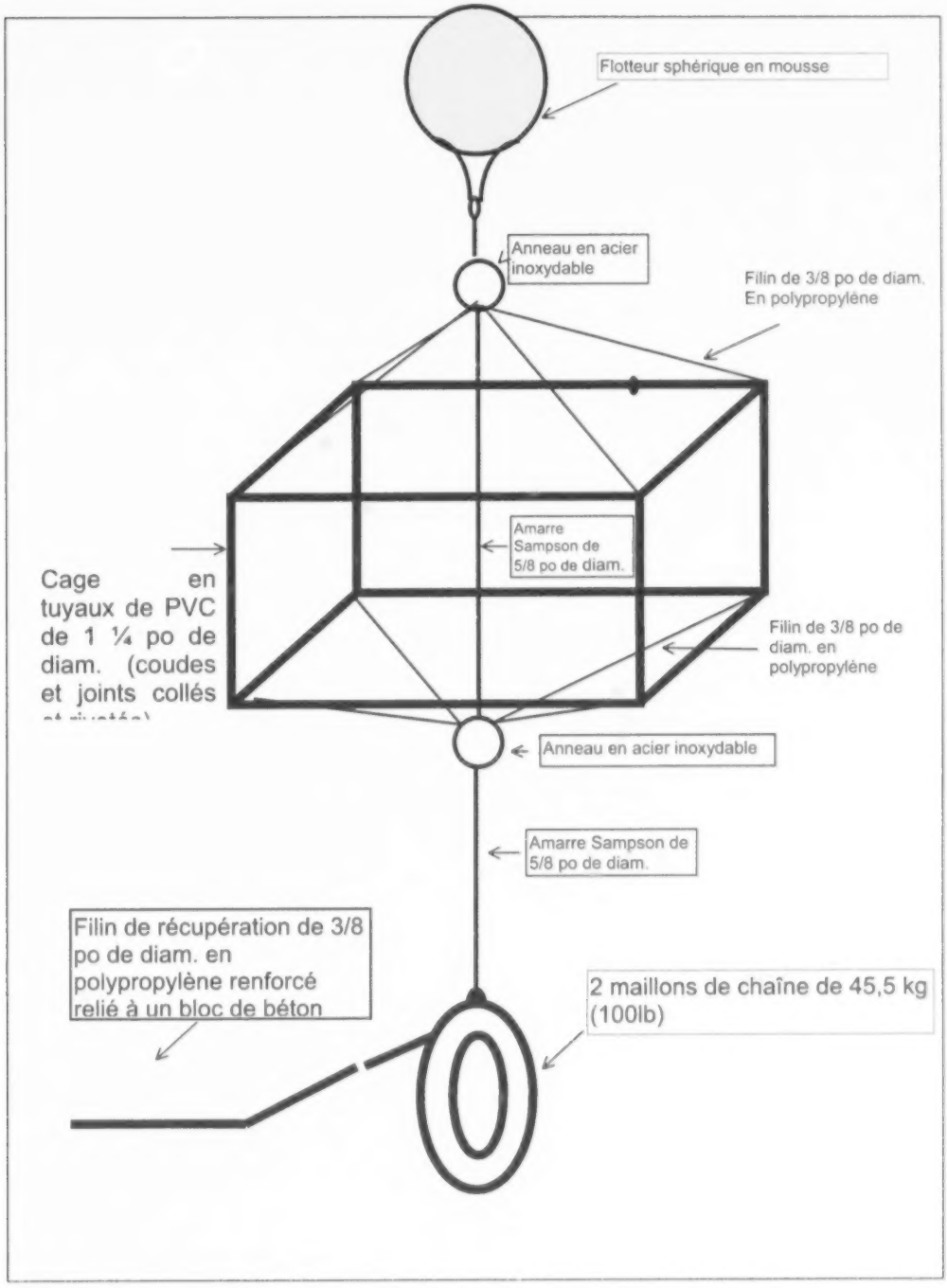


Figure 11-6: Exemple de système d'ancrage pour les bivalves

Tableau 11-9: Exemple de fiche de terrain pour l'enregistrement des données brutes sur la survie et la croissance

Fiche de données de terrain – Bivalves en cage

Zone d'étude _____ Numéro de la cage _____

Coordonnées : Latitude _____N Nbre de mollusques par cage _____
Longitude _____O

Date/heure de mise à l'eau _____ Date/heure de récupération _____

Nbre de jours d'exposition _____ Prof. de l'eau_____ Prof. de la cage _____

Numéro du mollusque	Longueur (à 0,01 mm près)	Longueur (à 0,01 mm près)	Poids humide du sujet (à 0,01 g près)	Poids humide du sujet (à 0,01 g près)	Poids humide des tissus mous (à 0,01 g près)
	Début	Fin	Début	Fin	Fin
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

Nombre de mollusques vivants à la fin de l'essai _____ Taux de survie en % _____

Conditions ambiantes

Date	Heure	Température (°C)	Concentration d'oxygène dissous (mg/L)	Salinité (ppt)	Vitesse du courant (cm/s)	Direction du courant (degrés)

Travail exécuté par :

_____

Notes :

_____

_

11.2.8.1 Survie

La survie n'est pas un indicateur particulièrement sensible des effets sur les bivalves en cage, mais constitue un paramètre important à surveiller. On peut facilement la déterminer et la quantifier, bien qu'il soit possible que certains spécimens soient manquants à la fin de l'essai en raison de la décomposition des coquilles. Les coquilles des bivalves morts sont grandes ouvertes et ne se ferment pas en réaction au toucher ou au tapotement. La survie s'exprime en pourcentage de sujets vivants par cage à la fin de la période d'exposition.

11.2.8.2 Croissance

La croissance est une mesure de l'utilisation de l'énergie et constitue un indicateur sensible des effets; elle est facile à mesurer. On peut prendre plusieurs types de mesures de la croissance, et le choix d'une seule d'entre elles peut conduire à des résultats trompeurs. Les mesures de la croissance sont exposées au tableau 10.

Tableau 11-10: Mesures de la croissance

Mesure de la croissance	**Moment de la mesure**		**Instrument de mesure**	**Précision[2]**
	Début de l'essai	**Fin de l'essai[1]**		
Poids humide du sujet (y compris la coquille)	✓	✓	Balance de précision	0,01 g
Longueur de la coquille	✓	✓	Pied à coulisse (axe le plus long)	0,01 mm
Poids frais des tissus mous	✓ (sur un sous-échantillon sacrifié)	✓	Balance de précision	0,01 g

[1]Les mesures à la fin de l'essai ne doivent être prises que sur les sujets survivants.

[2]La précision est fondée sur des espèces de bivalves plus grandes comme les moules marines et les unionidés dulcicoles. Il peut être nécessaire de la réviser à la baisse pour les espèces d'essai de plus petite taille comme les sphaeriidés.

Les mesures du poids humide du sujet et de la longueur de la coquille sont non destructives et devraient être prises sur chaque individu au début et à la fin de l'essai. Le poids frais des tissus mous devrait également être mesuré au début et à la fin de l'essai. Toutefois, comme il s'agit d'une mesure destructive, on devrait la prendre, au début de l'essai, sur un sous-échantillon de bivalves provenant de la même population et affichant la même plage de tailles que les organismes d'essai. Pour les tissus mous, on devrait prendre la mesure du poids frais (le poids des tissus doit être mesuré aussitôt que possible après la fin de l'essai, lorsque les tissus sont encore frais et avant qu'ils ne soient congelés ou desséchés). Les poids (poids humide du sujet et poids frais des tissus mous) devraient être mesurés à l'aide d'une balance de précision (degré de précision de 0,01 g). Il importe de mesurer la longueur de la coquille en utilisant un pied à coulisse sur l'axe le plus long; la précision de mesure de l'instrument doit être de 0,01 mm. Il est à noter que la précision de ces mesures peut devoir être révisée à la baisse pour les espèces d'essai de plus petite taille.

La croissance peut être exprimée de plusieurs manières :

- croissance absolue : changement de valeur en termes absolus entre le début et la fin de l'essai;

- taux de croissance : changement de valeur en termes absolus par unité de temps (habituellement, on utilise des intervalles d'une semaine);

- croissance relative : (poids final – poids initial)/poids initial; on peut utiliser la croissance relative lorsqu'il existe une différence significative entre les poids initiaux des sujets dans plusieurs cages. La croissance relative est exprimée comme une proportion, de sorte qu'il peut être approprié de procéder à une transformation des valeurs en racine carrée de l'arc-sinus avant d'appliquer les tests statistiques. Green (1979; page 52) fournit des conseils utiles sur cette transformation en faisant remarquer que celle-ci n'est habituellement pas nécessaire pour les données de proportions qui se situent entre 0,3 et 0,7 et que, si elle n'est pas toujours utile, elle ne nuit probablement pas non plus aux résultats.

Il convient d'utiliser l'expression de la croissance la plus appropriée en fonction du plan d'étude et des caractéristiques propres à chaque site.

11.2.8.3 Condition

La condition est une mesure de la façon dont l'animal stocke son énergie. Comme on le décrit ci-après, on peut considérer plus d'une option pour calculer la condition. Il convient de noter que certaines de ces méthodes nécessitent la mesure de variables additionnelles à celles qui ont été énumérées à la section 11.2.8.2. Le choix de la méthode la plus appropriée pour calculer la condition est laissé à la discrétion des chercheurs.

Poids (poids humide du sujet, poids de la coquille sèche ou poids des tissus mous) par rapport à la longueur de la coquille

Ce rapport est analogue à l'indice de condition de Fulton (Ricker, 1975; Anderson et Neumann, 1996) utilisé en biologie des pêches. Il peut être caractérisé selon une formule classique d'une ligne droite (p. ex. dans Mackie et Flippance, 1983) avec une pente (C) et une ordonnée à l'origine (b) :

$$\log W = b + (C \times \log L)$$

Les valeurs élevées de C signifient que le bivalve en cause possède un poids tissulaire relativement important pour une longueur donnée, tandis que les valeurs basses peuvent indiquer que le sujet n'obtient suffisamment de nourriture ou a été soumis à des conditions de stress chronique qui l'ont empêché de s'épanouir. Cette méthode de caractérisation convient à l'évaluation de la condition des bivalves sauvages, chez lesquels la longueur des coquilles peut présenter des variations assez importantes. Elle n'est toutefois pas fiable dans le cas des bivalves en cage car les animaux ont été triés au début de l'essai pour l'obtention d'une longueur uniforme. Elle peut également ne pas convenir dans le cas des bivalves, car plusieurs facteurs environnementaux influent sur la longueur des coquilles et le poids des tissus (M. Salazar, comm. pers.).

Poids des tissus mous par rapport au poids de la coquille

Cette méthode de caractérisation utilise le poids des tissus mous et le poids de la coquille. On peut mener une analyse de variance ou, plus simplement, diviser le poids des tissus mous par le poids de la coquille. Grout et Levings (2000) ont mesuré la condition de moules bleues en calculant le ratio entre le poids des tissus et le poids de la coquille. Leurs résultats indiquent que la condition permet de distinguer des moules en cage situées dans une zone caractérisée par un taux de survie élevé (indice de condition variant de 1,1 à 1,42) de moules en cage situées dans une zone marquée par un faible taux de survie (indice de condition variant de 0,82 à 0,96).

Poids des tissus mous par rapport au volume de la coquille

Mucklow (1996; d'après Seed, 1968) a utilisé cette méthode pour calculer la condition en divisant le poids sec des tissus mous par le volume de la coquille, lequel est le produit de la longueur, de la largeur et de la hauteur. Dans une étude de populations de moules bleues sauvages, il conclut que les variations saisonnières de l'indice de condition fluctuent et sont

tributaires d'un certain nombre de facteurs naturels, notamment la disponibilité de la nourriture et les besoins physiologiques en énergie (Mucklow, 1996).

11.2.9 Méthodes à utiliser pour le début de l'essai, le déploiement et la récupération des cages et la fin de l'essai

Ces méthodes, décrites de façon détaillée dans Salazar et Salazar (2000; section 11), sont résumées ci-après.

11.2.9.1 Début de l'essai

La première étape consiste à trier les bivalves en fonction de la plage de tailles désirée. En choisissant des sujets qui présentent une relative uniformité de taille ou d'âge, les chercheurs peuvent être relativement confiants que ceux-ci présenteront un potentiel de croissance similaire. La détermination de l'âge de spécimens prélevés dans la nature peut s'avérer difficile, voire impossible, pour certaines espèces. On utilise donc la longueur pour choisir des bivalves qui présentent un taux de croissance similaire. Les conchyliculteurs commerciaux peuvent souvent fournir des bivalves d'un âge connu.

La plage de tailles retenue pour les organismes d'essai est fonction de l'espèce choisie, des stocks disponibles pour l'approvisionnement en animaux et de l'âge ciblé. On devrait choisir des organismes d'essai à l'intérieur d'une plage de tailles étroite. Certains ont choisi des bivalves présentant une relative uniformité de taille et les ont répartis au hasard dans les cages (p. ex., Andrews et Parker, 1999); d'autres ont utilisé diverses catégories de tailles et réparti les sujets dans les cages de telle sorte qu'il n'y ait aucune différence significative entre les cages en ce qui concerne la taille et le poids initiaux (voir Salazar et Salazar, 2000; section 11).

Il importe de conserver les organismes d'essai froids et humides au cours du tri pour éviter le stress, les dommages et les mortalités (voir la section 12.2.4.7). On devrait enregistrer la longueur de la coquille et le poids humide de chacun des sujets, qui devrait être placé dans un contenant de stockage temporaire (p. ex., un plateau à glaçons) étiqueté en fonction de l'emplacement particulier qu'ils occupera dans la cage. Cette procédure permet la répétition de la prise de mesure sur chacun des spécimens à la fin de l'essai. Enfin, on mesurera la longueur des coquilles, le poids humide, le poids des tissus et le poids des coquilles sur un sous-échantillon d'organismes d'essai sacrifiés (composé d'un nombre d'animaux approprié du point de vue statistique).

Aux fins du contrôle de la qualité, environ 10 % des mesures devraient être répétées et enregistrées par un chercheur différent. Il est préférable d'utiliser un tableur électronique pour l'enregistrement des mesures afin de réduire les erreurs de transcription. On peut aussi brancher les instruments de mesure (p. ex., le pied à coulisse et la balance de précision) au tableur électronique pour un contrôle de la qualité plus poussé.

Tous les organismes d'essai nécessaires pour remplir les cages, ainsi qu'un sous-échantillon destructeur destiné à la pesée des tissus mous, devraient être triés et mesurés avant leur déploiement. Ils sont alors répartis en boudins, avant d'être attachés aux cages. Salazar et Salazar (2000; section 11) fournissent un exemple de plan d'étiquetage et de distribution.

On peut mener une analyse de variance pour vérifier la similarité statistique des poids humides des sujets et des longueurs des coquilles entre les stations. Cette analyse peut être programmée dans un tableur électronique de sorte que les données puissent être analysées par cage et par station (si l'on prévoit déployer plus d'une cage par station). Si l'on trouve une différence statistiquement significative, les animaux d'essai devraient être redistribués pour éliminer cette différence. On pourrait alors peut-être avoir à rouvrir les boudins et les refermer à l'aide d'une attache de plastique.

11.2.9.2 Déploiement des cages

Il faudrait s'assurer de disposer d'un bateau approprié pour transporter et déployer toutes les cages, leurs lignes d'ancrage et leurs bouées en toute sécurité. On peut attacher les lignes d'ancrage et les bouées aux cages à bord, durant le transport vers le site. Une fois sur place, il faudrait repérer l'emplacement des cages à l'aide d'un système GPS ou de toute autre méthode fiable (p. ex., en utilisant des repères sur la rive à proximité). On peut effectuer des inspections régulièrement durant la période d'exposition (p. ex., en recourant à un plongeur autonome) pour vérifier la présence des cages, leur condition et leur propreté.

11.2.9.3 Récupération des cages et fin de l'essai

Pour récupérer les cages, on peut utiliser divers outils de repérage (p. ex., des systèmes GPS ou des sondeurs) et un grappin si elles ont été munies d'une ligne de récupération.

Salazar et Salazar (2000; section 11) fournissent des détails sur la fin de l'essai, qui sont présentés ici. Les bivalves de tous les filets de chacune des cages devraient être traités ensemble au site où l'on prévoit prendre les mesures. Il est essentiel de conserver l'ordre et l'orientation de chaque bivalve durant la prise des mesures de fin d'essai. Pour ce faire, on peut retirer les sujets des boudins et les placer dans des contenants étiquetés (p. ex., des plateaux à glaçons) pour faciliter la prise des mesures.

Cinq ou dix minutes avant la mesure des longueurs et des poids, il convient de placer les contenants dans un bac rempli d'eau propre. Si les animaux flottent, cela indique la présence d'air entre les valves des coquilles. Lorsque tous les animaux situés dans le(s) contenant(s) ont légèrement ouvert leurs valves et ne flottent plus (après cinq à dix minutes) on peut débuter la prise des mesures. On commence par la mesure des poids humides et des longueurs des coquilles, puis on décoquille soigneusement chaque individu et on enlève l'excédent d'eau à l'aide d'un papier buvard avant de procéder à la mesure des poids frais. Il convient de noter que, si l'on prévoit d'analyser les tissus pour déceler la présence de

produits chimiques, il faut prendre garde de ne pas introduire de contaminants provenant du papier buvard.

11.2.10 Analyses des données

Les analyses des données et l'interprétation des résultats devraient être adaptées au plan d'étude. Les études de moules en cage menées dans le cadre de l'ESEE visent à déterminer s'il existe des effets significatifs sur le biote à proximité des points de rejet des effluents. On peut atteindre ce but en utilisant un plan contrôle-impact (référence-exposition) ou encore un plan par gradient (régression), comme on l'a mentionné dans la section 11.2.5. Les procédures statistiques appropriées pour chaque mesure terminale (c.-à-d. la survie, la croissance et la condition) sont résumées dans le tableau 11.

Tableau 11-11: Résumé des procédures statistiques permettant l'analyse des paramètres dans les études de bivalves en cage

Type de réponse	Paramètre	Procédures statistiques
Survie	Survie	ANOVA
Utilisation de l'énergie	Croissance (longueur des coquilles)	ANOVA (analyse de régression pour les plans par gradient)
	Croissance (poids humide des sujets)	ANOVA (analyse de régression pour les plans par gradient)
	Croissance (poids frais des tissus mous)	ANOVA (analyse de régression pour les plans par gradient)
Stockage de l'énergie	Condition	ANOVA ou ANCOVA[1]
Bioaccumulation*	Chimie tissulaire*	Statistiques multivariées

*Dans le cadre des ESEE, la nécessité d'analyser ce paramètre est tributaire de facteurs propres à chaque site, mais celui-ci peut être utile pour l'interprétation des résultats.

La première étape consiste à produire des statistiques sommaires pour chaque paramètre (c.-à-d. le poids humide des sujets, la longueur des coquilles, le poids frais des tissus mous) et pour chaque cage ou station.

La deuxième étape vise à déterminer s'il existe des différences significatives entre les cages-réplicats pour chacun des paramètres mesurés avant le déploiement (s'ils n'ont pas été mesurés après la distribution et avant le déploiement). Pour ce faire, on évalue la normalité des données et l'homogénéité des variances.

La dernière étape consiste à appliquer le test statistique approprié au plan d'étude (voir le tableau 4). En général, on utilise des analyses de variance (ANOVA) et des tests de comparaisons multiples pour vérifier l'hypothèse et pour effectuer des comparaisons entre les stations. Pour les plans d'échantillonnage C-I et C-IM auxquels on associe respectivement des analyses de variance (ANOVA) et des analyses de covariance (ANCOVA), on trouvera des indications détaillées dans les sections 5.1.5.3 à 5.1.5.5 et 5.1.6.1 du *Guide technique pour l'ESEE par les fabriques de pâtes et papiers* (Environnement Canada, 1998) et la section 5.16 du *Guide technique pour l'ESEE par les mines de métaux* (Environnement Canada, 2001). Si l'on trouve une différence statistiquement significative, on peut utiliser un test de comparaisons multiples ou son équivalent pour des données non paramétriques afin de déterminer quelles stations sont différentes des autres. En général, on peut utiliser les analyses de régression linéaire et multiple (en effectuant la régression des variables sur la distance) pour établir des relations entre les variables le long du gradient d'exposition. Pour les analyses de covariance de la condition, les covariables seront fonction de la formule de calcul choisie.

11.2.11 Concentrations tissulaires

11.2.11.1 Dioxines et furannes

Si une fabrique doit mesurer les concentrations de dioxines et de furannes dans les tissus des poissons, on peut envisager de le faire chez des bivalves en cage. Il faut toutefois prendre certaines précautions lorsqu'on utilise cette approche, notamment :

- établir la durée d'exposition de sorte que les dioxines et les furannes puissent s'accumuler dans les tissus des bivalves à des concentrations décelables;
- tenir compte de la récolte éventuelle (commerciale ou récréative) de bivalves pour la consommation humaine dans la zone en question;
- s'assurer d'inclure, dans le plan d'étude, un nombre suffisant de bivalves pour obtenir la quantité de tissus nécessaire aux analyses.

Il est possible que, pour certaines fabriques, l'utilisation de bivalves en cage pour mesurer l'assimilation des dioxines et des furannes ne soit pas appropriée. Toute proposition visant à utiliser cette méthode pour la mesure des concentrations de dioxines et de furannes devrait recevoir l'approbation de l'agent régional d'autorisation.

11.2.11.2 Autres produits chimiques

Si une fabrique particulière doit mesurer les concentrations tissulaires de certains produits chimiques pour évaluer leur biodisponibilité, il faudrait se reporter aux indications de Salazar et Salazar (2000; section 11) sur les plans d'échantillonnage et la manipulation.

11.2.12 Rapports

Les exigences relatives à l'assurance de la qualité (AQ) et au contrôle de la qualité (CQ) pour les études de bivalves en cage sont les mêmes que celles exposées dans la section 5.1.8 du *Guide technique pour l'ESEE par les fabriques de pâtes et papiers* (Environnement Canada, 1998) et la section 4.14 du *Guide technique pour l'ESEE par les mines de métaux* (Environnement Canada, 2001) et qui concernent les études de population de poissons. Les mesures d'AQ et de CQ s'appliquent aux composantes suivantes des études de bivalves en cage :

- plan d'étude;
- échantillonnage sur le terrain;
- traitement des échantillons et analyses en laboratoire;
- analyses des données;
- rapports.

11.2.13 Références

Anderson, R.O. and R.M. Neumann. 1996. Length, weight, and associated structural indices. Pp. 447-482. In: B.R. Murphy and D.W. Willis (eds.). Fisheries Techniques. Second Edition. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

Andrews, S. and R. Parker. 1999. Draft Report (II). An Environmental Quality Evalutaion of Pictou Harbour, Nova Scotia, Using Caged Bivalves; *Mytilus edulis*. Prepared by Environmental Protection Branch of Environment Canada (Dartmouth, NS) for The Pictou Harbour Environmental Protection Project, New Glasgow, NS.

ASTM 2001. Standard Guide for Conducting In-situ Field Bioassays with Marine, Estuarine and Freshwater Bivalves, E-2122. American Society forTesting and Materials. Conshohocken, PA, pp. 1546-1575.

BC Research Inc. 1998. Methyl Mercury Impact Assessment for Nechako Reservoir Submerged Timber Salvage Operations: Caged Mussel Study. Prepared for Ministry of Environment, Lands and Parks, Environmental Protection – Skeena Region, Environmental Impact Section, Smithers, BC.

Beckvar, N., S. Salazar, M. Salazar and K. Finkelstein. 2000. An in situ assessment of mercury contamination in the Sudbury River, Massachusetts, using transplanted freshwater mussels (*Elliptio complanata*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57: 1103-1112.

Clarke, A.H. 1973. The freshwater molluscs of the Canadian interior basin. Malacologia 13, (1-2): 1-509.

Clarke, A.H. 1981. The freshwater molluscs of Canada. National Museum of Natural Sciences, National Museums of Canada, Ottawa, ON. 446 pp.

Couillard, Y., P.G.C. Campbell, A. Tessier, J. Pellerin-Massicotte and J.C. Auclair. 1995a. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 52: 690-702.

Couillard, Y., P.G.C. Campbell, A. Tessier, J. Pellerin-Massicotte and J.C. Auclair. 1995b. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 52: 703-715.

Courtenay, S.C., W.R. Parker and G.P. Rawn. 1998. Proceedings of a workshop to assess alternatives to the fish survey component of the environmental effects monitoring program for Canadian pulp and paper mills. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci., 2233: viii + 108 pp.

Day, K.E., J.L. Metcalfe and S.P. Batchelor. 1990. Changes in intracellular free amino acids in tissues of the caged mussel, *Elliptio complanata*, exposed to contaminated environments. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19: 816-827.

Environment Canada. 2001. Metal Mining Guidance Document for Aquatic Environmental Effects Monitoring. Environment Canada. Hull, Québec (draft).

Environment Canada. 1998. Pulp and Paper Technical Guidance for Aquatic Environmental Effects Monitoring EEM/1998/1.

Freeman, K.R., K.L. Perry, T.G. DiBacco and D.J. Scarratt. 1994. Observations on two Mytilid species from a Nova Scotian mussel farm. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. No. 1969.

GMCME (Gulf of Maine Council on the Marine Environment). 1992. Evaluation of Gulfwatch 1991 Pilot Project of the Gulf of Maine Marine Environmental Monitoring Plan. Gulf of Maine Council on the Marine Environment, State Planning Office, August, ME.

Goldberg, E.D., V.T. Bowen, J.W. Farrington, G. Harvey, J.H. Martin, P.L. Parker, R.W. Risebrough, W. Robertson, E. Schneider and E. Gamble. 1978. The Mussel Watch. Environ. Conserv., 5(2): 101-125.
Green, R.H. 1979. Sampling Design and Statistical Methods for Environmental Biologists. John Wiley & Sons, Toronto, ON. 257 pp.

Grout, J.A. and C.D. Levings. 2000. Effects of acid mine drainage from an abandoned copper mine, Britannia Mines, Howe Sound, British Columbia, Canada, on transplanted blue mussels (*Mytilus edulis*). Marine Environmental Research, 51(3): 265-288.

Hinch, S.G. and R.H. Green. 1989. The effects of source and destination on growth and metal uptake in freshwater clams reciprocally transplanted among south central Ontario lakes. Can. J. Zool., 67: 855-863.

Hornbach, D.J., T.E. Wissing and A.J. Burky. 1982. Life-history characteristics of a stream population of the freshwater clam *Sphaerium striatinum* Lamarck (Bivalvia: Pisidiidae). Can. J. Zool., 60: 249-260.

Hurlbert, S.H. 1984. Pseudoreplcation and the design of ecological field experiments. Ecol. Monog., 54: 187-211.

Jernelov, A. 1996. The International Mussel Watch: A global assessment of environmental levels of chemical contaminants. Sci. Tot. Environ., 188 (Suppl. 1): 37-44.

M ckie, G.L. 1978a. Effects of pollutants on natality of *Musculium securis* (Bivalvia: Pisidiidae). The Nautilus, 92 (1): 25-33.

Mackie, G.L. 1978b. Are sphaeriid clams ovoviviparous or viviparous? The Nautilus, 92: 145-147.

Mackie, G.L., S.U. Qadri and A.H. Clarke. 1974. Development of brood sacs in *Musculium securis* Bivalvia: Sphaeriidae. The Nautilus, 88: 109-111.

Mackie, G.L. and L.A. Flippance. 1983. Growth dynamics in *Sphaerium rhomboideum* (Bivalvia: Pisidiidae). Can. J. Zool., 61: 868-873.

Malley, D.F., A.R. Stewart and B.D. Hall. 1996. Uptake of methyl mercury by the floater mussel, *Pyganodon grandis* (Bivalvia, Unionidae) caged in a flooded wetland. Environ. Toxicol. Chem., 6: 928-936.

McMahon, R.F. 1991. Mollusca: Bivalvia. In J.H. T.G. Horp and A.P. Covich (eds). Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press Inc., San Diego, California. Pp. 315-399.

Metcalfe-Smith, J.L., R.H. Green and L.C. Grapentine. 1996. Influence of biological factors on concentrations of metals in the tissues of freshwater mussels (*Elliptio complanata* and *Lampsilis radiata radiata*) from the St. Lawrence River. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 53: 205-19.

Mucklow, L.C. 1996. Effects of season and species on physiological condition and contaminant burdens in mussels (*Mytilus edulis L.* and *Mytilus trossulus G.*): implications for mussel watch

programs. Thesis submitted in partial fulfillment of requirements for Master of Environmental Studies, School for Resource and Environmental Studies, Dalhousie University, Halifax, NS.

Newell, R.I.E. 1989. Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (North and Mid-Atlantic) – Blue Mussel. U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep. 82 (11.102). US. Army Corps of Engineers, TR EL-82-4.

Nichols, S.J. 2000. Nonindigenous Species Research and Outreach. Life History and Ecological Requirements of the Zebra Mussel – North American Experience Through 1992. http://www.nsgo.seagrant.org/research/nonindigenous /zmlifehistory.html.

O'Connor. 1992. Recent trends in coastal environmental quality: Results from the first five years of the NOAA Mussel Watch Project. Washington, DC. U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), National Ocean Service.

Paine, M.D. 2000. EEM Design. Short-Course presented at the 27th Annual Aquatic Toxicity Workshop, October 1-4th, St. John's, NF.

Ricker, W.E. 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. Bulletin 191. Department of the Environment and Fisheries and Marine Service. Ottawa, ON.

Salazar, M. 2001. Applied Biomonitoring, Seattle, WA. Personal Communication via conference call, March 2001.

Salazar, M.H. and S.M. Salazar. 1995. In situ bioassays using transplanted mussels: I. Estimating chemical exposure and bioeffects with bioaccumulation and growth. Pp: 216-241. In: J.S. Hughes, G.R. Biddinger and E. Mones (eds). Environmental Toxicology and Risk Assessment – Third Volume. American Society for Testing and Materials (ASTM), Philadelphia, PA.

Salazar, M. and S. Salazar. 2000. Standard Guide for Conducting In-Situ Field Bioassays with Caged Marine, Estuarine and Freshwater Bivalves. (Draft dated November 17, 2000). American Society for Testing and Materials (ASTM), Philadelphia, PA. Accepted for publication in 2001.

Sandusky, M.J. and R.E. Sparks. 1979. Investigations of declines in fingernail clam (Musculium transversum) populations in the Illinois River and Pool 19 of the Mississippi River. Bull. Amer. Malacol. Union Inc., 1979: 11-16.

Seed, R. 1968. Factors influencing shell shape in *Mytilus edulis* L. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 48: 561-584.

Skidmore, D. and K.K. Chew. 1985. Mussel aquaculture in Puget Sound. Washington Sea Grant Publication, Seattle, Washington.

Stephenson, M. and G.L. Mackie. 1981. Effects of 2, 4-D treatment on growth and survival of fingernail clams (Bivalvia: Pisidiidae) in artificial pond ecosystems. Bull. Amer. Malacological Union, 1981: 19-22.

Stewart, P.L. 1994. Environmental requirements of the blue mussel (*Mytilus edulis*) in Eastern Canada and its response to human impacts. Can. Tech. Rep. Fisheries Aquat. Sci., 2004. 41 pp.

Stewart, R. and D.F. Malley. 1997. Technical evaluation of molluscs as a biomonitoring tool for the Canadian mining industry. Aquatic Effects Technology Evaluation (AETE) Program Project 2.3.1. Sponsored by Canada Center for Mineral and Energy Technology (CANMET) and the Mining Association of Canada (MAC).

Virginia Tech. 2000. Fish and Wildlife Information Exchange, Conservation Management Institute, Species Profile. Blacksburg, VA.

Waldock, M.J., J.E. Thain and M.E. Waite. 1996. An assessment of the value of shell thickening in *Crassostrea gigas* as an indicator of exposure to tributyltin. Pp. 219-237. In: M.A. Champ and P. F. Seligman (eds). Tributyltin: Environmental Fate and Effects. Chapman and Hall, London.

Williams, J.D., M.L. Warren Jr., K.S. Cummings, J.L. Harris and R.J. Neves. 1993. Conservation status of freshwater mussels of the United States and Canada. Fisheries, 18 (9): 6-22.